

CAROLINA BORSOI MORAES

**ORGANIZAÇÃO ESPACIAL DA TRANSCRIÇÃO COMO UM
POTENCIAL MECANISMO DE EXPRESSÃO GÊNICA EM
*Plasmodium falciparum***

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

**São Paulo
2009**

CAROLINA BORSOI MORAES

**ORGANIZAÇÃO ESPACIAL DA TRANSCRIÇÃO COMO UM
POTENCIAL MECANISMO DE EXPRESSÃO GÊNICA EM
*Plasmodium falciparum***

Orientador: Prof. Dr. José Franco da Silveira
Co-orientador: Dr. Lucio H. Freitas-Junior

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

**São Paulo
2009**

Moraes, Carolina Borsoi

Organização espacial da transcrição como um potencial mecanismo de expressão gênica em *Plasmodium falciparum*

/Carolina Borsoi Moraes -- São Paulo, 2009.

xiv, 120f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós Graduação em Microbiologia e Imunologia.

Título em inglês: Spatial organization of transcription as a potential gene expression mechanism in *Plasmodium falciparum*

1. *Plasmodium falciparum*. 2. expressão gênica. 3. organização nuclear. 4. *fluorescence in situ hybridization*.

Trabalho realizado na Disciplina de Parasitologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, em colaboração com o Institut Pasteur Korea da Coreia do Sul, com auxílios financeiros concedidos pelos Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Ministério da Educação, Ciência e Tecnologia da Coreia do Sul (MEST), Governo da província de Gyeonggi da Coreia do Sul, e Instituto Coreano de Informação Científica e Tecnológica (KISTI).

*Aos meus pais, Lucia e Adilson,
por todo o apoio às minhas escolhas*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor José Franco da Silveira, pelo apoio imprescindível a esta tese. Obrigada pelos conselhos, por toda a ajuda e pela paciência.

Ao Lucio, pelos aprendizados, pelas oportunidades, pela motivação, pela alegria, e por sempre acreditar em mim. Você é, sem dúvidas, o meu maior colaborador.

À comissão de Pós-graduação do Departamento de Micro, Imuno e Parasitologia da UNIFESP, por terem apoiado a minha vinda ao Institut Pasteur Korea.

Ao Institut Pasteur Korea, pelo apoio financeiro e científico.

À minha primeira orientadora, Dra. Maria Lucia Cardoso de Almeida, com quem muito aprendi sobre Ciência.

Ao Professor Sergio Schenkman, pelos conselhos e conversas.

À Mércia V. Maia, pela ajuda com os trâmites relacionados à tese.

Aos docentes, funcionários e alunos da Disciplina de Parasitologia, pela convivência sempre agradável e produtiva durante meu primeiro ano de doutorado.

Às minhas colegas e grandes amigas Miriam A. Giardini, Mónica Contreras-Dominguez e Luciana G. Gentil. Nunca me esquecerei de todo apoio e carinho, dentro e fora do laboratório. Vocês têm estado sempre presentes.

Aos meus colegas e amigos de laboratório Jair, Fernando, Gyongseon, Minje, Eunhye, Helena e Mariana, pelas discussões, amizade, companheirismo e ajuda. Vocês sem dúvida fazem minha vida na Coréia muito mais interessante e divertida.

Ao colaborador Thierry Dorval, com quem muito aprendi, obrigada pela prestatividade e pelas discussões.

Às minhas antigas colegas de laboratório, Rose, Gisela e Silene, pela ajuda e pela amizade.

Aos meus colegas do Institut Pasteur Korea por todo o apoio e convivência, em especial à minha querida amiga Heejin Chung.

Aos meus amigos da Bio34, pelos anos inesquecíveis de UNIFESP.

À minha família. Sem vocês, nada disso seria possível. Valeu o sacrifício!

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	v
Lista de figuras	viii
Lista de tabelas	x
Resumo	xi
Abstract	xiii
1. Introdução	1
1.1 A doença e o parasita	1
1.2 Organização do genoma nuclear de <i>P. falciparum</i>	4
1.3 Controle molecular do desenvolvimento	5
1.4 Regulação da expressão gênica em <i>P. falciparum</i>	7
1.5 Formas alternativas de regulação da transcrição durante o ciclo eritrocítico	10
1.6 Controle epigenético da expressão gênica e genes <i>var</i>	11
1.7 O papel da organização nuclear na expressão gênica	14
1.8 A organização espacial da transcrição e a posição nuclear de genes co-regulados	16
2. Objetivos	19
3. Material e Métodos	20
3.1 Composição de soluções e tampões	20
3.2 Meios de cultura e soluções de sincronização de <i>P. falciparum</i>	20
3.3 Cultivo e sincronização de <i>P. falciparum</i>	21
3.4 Marcação de RNA nascente <i>in situ</i> por incorporação de BrUTP	22
3.5 Ensaio de imunofluorescência para proteínas nucleares.....	23
3.6 Preparação de sondas de DNA para <i>Fluorescence in situ hybridization</i> (FISH)	24
3.7 Fixação de parasitas para FISH.....	25
3.8 Protocolo de FISH.....	26
3.9 Aquisição de imagens.....	27
3.10 Análise automatizada de imagens	27
3.11 Análise da distribuição radial dos <i>clusters</i> teloméricos	30
3.12 Análise da colocalização de sondas de telômero e Rep20 em P1- e P2-FISH	31
3.13 Análises estatísticas.....	31
4. Resultados e Discussão	34

4.1 Estudos <i>in situ</i> da síntese de RNA nascente mostram que transcrição é organizada em fábricas em <i>P. falciparum</i>	34
4.2 A análise automatizada de imagem em 3D indica que fábricas de transcrição são estruturas dinâmicas.....	37
4.3 O número de fábricas de transcrição está fracamente correlacionado com volume nuclear.....	44
4.4 Parasitas em diferentes fases do ciclo eritrocítico apresentam distribuição espacial distinta das fábricas de transcrição.....	46
4.5 A transcrição ocorre preferencialmente em áreas de baixa densidade de cromatina.....	50
4.6 Fábricas de transcrição definem um compartimento nuclear distinto de zonas de silenciamento em <i>P. falciparum</i>	55
4.7 O marcador nucleolar PfNop1 colocaliza apenas parcialmente com fábricas de RANpoll.....	56
4.8 Modificações de histonas características da cromatina ativa não determinam não o compartimento de transcrição.....	59
4.9 Considerações sobre a arquitetura da transcrição e organização espacial da cromatina.....	62
4.10 Um novo protocolo para FISH resulta em núcleos mais conservados.....	65
4.11 Análise automatizada de imagens em 3D mostra que P2-FISH resulta em volume nuclear mais conservado e menor variabilidade no número de <i>clusters</i> teloméricos.....	69
4.12 Núcleos preparados por P2-FISH apresentam melhor preservação da distribuição periférica dos <i>clusters</i> teloméricos.....	73
4.13 Um maior índice de colocalização entre sondas telomérica e de Rep20 é observado em núcleos de P2-FISH.....	77
5. Conclusões e Perspectivas.....	81
6. Referências Bibliográficas.....	83
7. Anexos.....	96

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida do parasita <i>Plasmodium falciparum</i>	2
Figura 2. Mecanismos de patogênese mediados por PfEMP1.....	3
Figura 3. Características morfológicas dos quarto estágios de desenvolvimento de <i>P. falciparum</i> ao longo do ciclo eritrocítico.....	5
Figura 4. Transcriptoma do ciclo eritrocítico.....	9
Figura 5. Organização da transcrição em fábricas.....	17
Figura 6. Detecção automatizada de estruturas nucleares.....	32
Figura 7. A transcrição é organizada em estruturas pontuadas e dispersas por todo o núcleo em <i>P. falciparum</i>	36
Figura 8. Perfil de transcrição em diferentes fases do ciclo de vida.....	38
Figura 9. O número de fábricas de transcrição está apenas parcialmente correlacionado com o volume nuclear.....	45
Figura 10. Redistribuição das fábricas de transcrição durante o ciclo eritrocítico.....	47
Figura 11. Intensidade das fábricas de transcrição não está relacionada com a posição da fábrica no núcleo.....	52
Figura 12. Fábricas de transcrição localizam-se preferencialmente em zonas de baixa densidade de cromatina.....	53
Figura 13. Fábricas de transcrição localizam em um compartimento nuclear diferenciado de áreas de silenciamento e do nucléolo.....	58
Figura 14. Fábricas de transcrição localizam em um compartimento nuclear diferenciado da cromatina ativa e da modificação H3K79me3.....	61
Figura 15. Hipóteses sobre a organização da cromatina e da transcrição em <i>P. falciparum</i>	64
Figura 16. Núcleos de parasitas submetidos ao protocolo P1-FISH são mais deformados (menos compactos) do que núcleos de parasitas submetidos ao protocolo P2-FISH.....	67
Figura 17. Parasitas submetidos a P1- apresentam núcleos mais largos e maior número de sinais teloméricos que parasitas submetidos a P2-FISH...	72
Figura 18. P1-FISH causa a redistribuição dos <i>clusters</i> teloméricos para zonas centrais.....	76

Figura 19. P2-FISH resulta em índices de colocalização telômero-Rep20 mais altos.....80

Lista de tabelas

Tabela 1. Quantificação do número de fábricas de transcrição detectadas de forma automatizada em parasitas a 10 e a 22 hpi.....39

Tabela 2. Número teórico médio de genes compartilhando uma mesma fábrica a 10 e a 22 hpi.....41

Tabela 3. Quantificação do número de sinais de telômero e de Rep20 detectados em P1- e P2-FISH de duas cores, e análise da porcentagem de colocalização total ou parcial, ou ausência de colocalização, entre as duas sondas.....77

Resumo

Crescentes evidências mostram que a organização espacial da transcrição é um fator epigenético importante na regulação gênica em eucariotos. Em células de mamíferos, os genes são transcritos em estruturas nucleares discretas conhecidas como fábricas de transcrição, e genes com funções relacionadas e co-regulados compartilham as mesmas fábricas de transcrição. *Plasmodium falciparum* apresenta um padrão de expressão gênica bastante complexo durante o ciclo eritrocítico, contrastando paradoxalmente com o baixo número de putativos fatores de transcrição codificados pelo seu genoma. Por outro lado, mecanismos epigenéticos são importantes na regulação gênica neste parasita. Nesta tese, investigamos a organização da transcrição em *P. falciparum* visando determinar se a organização nuclear está relacionada com a expressão/regulação gênica ao longo do desenvolvimento do parasita.

Com este objetivo, marcamos transcritos nascentes com BrUTP em formas eritrocíticas de *P. falciparum*. Assim como em mamíferos, a transcrição no parasita também está organizada em focos nucleoplásmicos discretos, chamados fábricas de transcrição. Análises automatizadas de imagens em 3D mostram que o número e a intensidade das fábricas de transcrição variam durante o ciclo eritrocítico, estando correlacionados com o número de genes expressos em cada estágio, mas não com o volume nuclear. O baixo número de fábricas indica que os genes ativos compartilham as fábricas enquanto estão sendo transcritos.

Surpreendentemente, as fábricas são espacilmente redistribuídas durante o desenvolvimento de anéis para trofozoítas, com a periferia nuclear sendo a zona de transcrição favorita nos anéis, enquanto nos trofozoítas as fábricas estão igualmente distribuídas por todo o nucleoplasma. Também observamos que a transcrição por RNA polimerase I ocorre principalmente nas áreas centrais dos núcleos em trofozoítas, sugerindo que os componentes nucleolares podem ser dispersos devido à entrada na fase S. Assim como nos eucariotos superiores, as fábricas de transcrição em *P.*

falciparum também se localizam em áreas nucleares com baixa densidade de cromatina.

Análises de imunofluorescência combinando incorporação de BrUTP com marcadores nucleares mostram que as fábricas de transcrição formam um compartimento exclusivo, diferente do compartimento de silenciamento definido por PfSir2A ou do compartimento de cromatina ativa definido por H4ac ou H3K79me3. Para estudar a organização espacial da cromatina e entender como os genes co-regulados interagem com as fábricas de transcrição, decidimos realizar ensaios de hibridização fluorescente *in situ* (*fluorescence in situ hybridization*, FISH).

Durante a realização de ensaios de FISH seguindo protocolos publicados, observamos uma grande variação na morfologia nuclear dos parasitas, o que nos moveu a otimizar esta técnica. Utilizando análises automatizadas de imagens, mostramos que os parasitas desidratados por secagem ao ar e fixados por curtos períodos de tempo à temperatura ambiente apresentam uma variação intra-populacional maior em relação à forma e ao volume nucleares após o ensaio de FISH, assim como valores de volume quase duas vezes maiores, do que núcleos de parasitas fixados em suspensão por longos períodos de tempo e em baixas temperaturas. Também observamos que a fixação em suspensão leva a uma melhor conservação da estrutura nuclear, e índices de colocação mais altos para duas sondas de repetições adjacentes das extremidades cromossômicas, Rep20 e telômeros. Em resumo, nossos resultados mostram que o tipo de protocolo de fixação utilizado antes da realização do desenvolvimento de FISH é um fator crucial para a conservação apropriada da arquitetura nuclear.

Abstract

Growing evidence points that transcription spatial organization is an important epigenetic factor for eukaryotes gene regulation. In mammalian cells, genes are transcribed in discrete nuclear structures known as transcription factories, and developmentally co-regulated, functionally related genes have been shown to share factories. *Plasmodium falciparum* shows a remarkably complex pattern of gene expression during the erythrocytic cycle, paradoxically contrasting with the low number of putative transcription factors encoded by its genome. However, epigenetic mechanisms are important for gene regulation in this parasite. In this thesis, we investigated transcription organization of *P. falciparum* in order to determine if nuclear architecture is related with developmentally regulated gene expression.

To this aim, we have labeled nascent transcripts with BrUTP in *P. falciparum* erythrocytic forms. Transcription is organized in discrete nucleoplasmic foci, the transcription factories. Automated 3D analysis of confocal images shows the number and intensity of transcription factories change during the erythrocytic cycle, correlating with the number of genes expressed at each stage but not with the nuclear volume. The low number of factories indicates that active genes share factories while being transcribed.

Unexpectedly, factories spatially redistribute from ring to trophozoites, being the nuclear periphery the preferential transcription zone in rings while in trophozoites factories are equally distributed throughout the nucleoplasm. We also observed that RNAPolymerase I transcription occurs mostly at central nuclear areas in trophozoites, suggesting that nucleolar components may be dispersed upon S phase transition. Like in higher eukaryotes, in *P. falciparum* transcription factories occur on nuclear areas with low chromatin density.

Immunofluorescence analysis of *P. falciparum* nuclear markers combined with BrUTP incorporation show that transcription factories are a novel and exclusive nuclear compartment, different from the silent compartment defined by PfSir2A or the active chromatin compartment defined by H4ac and H3K79me3. In order to study the spatial organization of chromatin, and how co-regulated, functionally related genes interact with

transcription factories, we decided to perform fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

While performing FISH with published protocols, we observed great variation in the parasite nuclear morphology, prompting us to optimize this technique. Using automated image analysis, we show that parasites dehydrated by air-drying and fixed for short periods at room temperature present after FISH higher intra-population variation of nuclear shape and volume, as well as almost two-times higher relative volume values, than parasite nuclei fixed in suspension for long periods at low temperatures. We also observe that longer fixation in suspension leads to improved conservation of the nuclear structure, with chromosome end clusters preferentially locating at the nuclear periphery, and higher colocalization indexes for two adjacent chromosome end probes, Rep20 and telomere. Overall, our results show that the type of fixation protocol applied prior to FISH is crucial for the conservation of nuclear architecture.

1. Introdução

1.1 A doença e o parasita

Anualmente ocorrem de 300 a 500 milhões de casos de malária em todo o mundo, resultando em mais de 1 milhão de mortes. Quase metade da população mundial vive em áreas endêmicas da doença, que é transmitida ao homem pela picada do mosquito *Anopheles*. A malária de humanos é causada por quatro espécies de parasitas do gênero *Plasmodium* (filo *Apicomplexa*): *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Recentemente, foi descrito que *P. knowlesi*, um plasmódio que normalmente infecta primatas, pode também infectar humanos com certa frequência, sobretudo no sudeste asiático, e é potencialmente fatal (Cox-Singh *et al.*, 2008; White, 2008), e desde então *P. knowlesi* tem sido considerada a quinta espécie causadora de malária em humanos.

De todas essas espécies, *P. falciparum* é a mais mortal e portanto a mais estudada. O parasita apresenta um ciclo de vida complexo, compreendendo diversos estágios de desenvolvimento distintos tanto em termos morfológicos quanto em termos moleculares (figura 1). Durante a picada do mosquito *Anopheles*, a forma do parasita denominada esporozoíta é inoculada na pele do hospedeiro (figura 1-1). Os esporozoítas migram, via corrente sanguínea, até o fígado (figura 1-2), onde infectam os hepatócitos (figura 1-3). Durante esse estágio, que em infecção por *P. falciparum* é curto e assintomático, os esporozoítas multiplicam-se e diferenciam-se em merozoítas, que deixam o fígado em estruturas chamadas merossomos [figura 1-4; (Sturm *et al.*, 2006)] para entrar na corrente sanguínea e invadir os eritrócitos em circulação, estabelecendo assim o ciclo eritrocítico ou assexual (figura 1-5). O ciclo eritrocítico é o responsável pelos sintomas da malária e pela perpetuação do parasita no hospedeiro. Nos eritrócitos, os merozoítas diferenciam-se na forma chamada de anel, que cresce à medida que se desenvolve em trofozoíta, um estágio morfológicamente distinto. Os trofozoítas continuam a crescer até quando a replicação de DNA se inicia,

estabelecendo-se então a fase de esquizogonia. Durante essa fase, um único trofozoíta se multiplica diversas vezes de forma assexuada, originando de 8 a 32 merozoítas. Os merozoítas rompem o eritrócitos e caem na circulação, invadindo novas hemácias. Eventualmente, alguns trofozoítas não entram em esquizogonia, mas se desenvolvem em gametócitos masculinos ou femininos (figura 1-6), que serão transmitidos ao mosquito durante uma picada. No mosquito, os gametócitos diferenciam-se em gametas, que se reproduzem sexuadamente por fecundação (figura 1-7). O zigoto, denominado oocineto (figura 1-8), invade a parede do epitélio do tubo digestivo e diferencia-se no oocisto, a fase na qual ocorre multiplicação por esporogonia, originando os esporozoítas, que rompem o oocisto e migram para a glândula salivar do mosquito (figura 1-9), sendo inoculados em humanos durante uma próxima picada (figura 1-10).

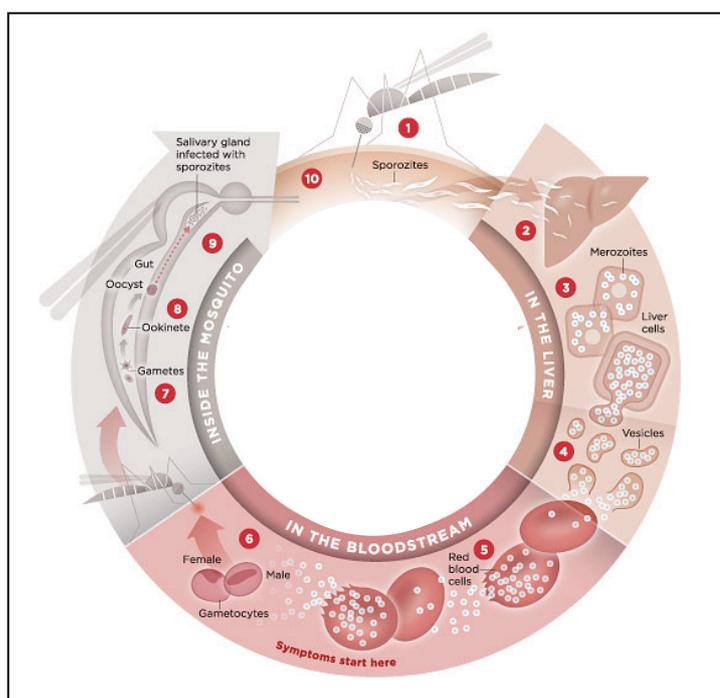


Figura 1. Ciclo de vida do parasita Plasmodium falciparum. (1-4) ciclo hepático; (5-6) ciclo eritrocítico; (7-10) ciclo sexual e esporogonia. (modificado de <http://www.path.org/vaccinresources/details.php?i=747>.)

Uma das características mais marcantes do ciclo eritrocítico é a intensa remodelagem que o parasita induz na hemácia infectada. A fim de escapar do sistema imune, *P. falciparum* modifica a superfície do eritrócito, expressando proteínas que aderem a receptores do endotélio capilar e da

placenta (Maier *et al.*, 2009). Esse fenômeno é chamado de citoadesão ou seqüestro e é mediado pela *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1*, ou PfEMP1. A citoadesão é um dos principais mecanismos de escape da resposta imune e pode ocorrer em órgãos vitais como o cérebro (malária cerebral) e a placenta (malária associada à gravidez – ver figura 2).

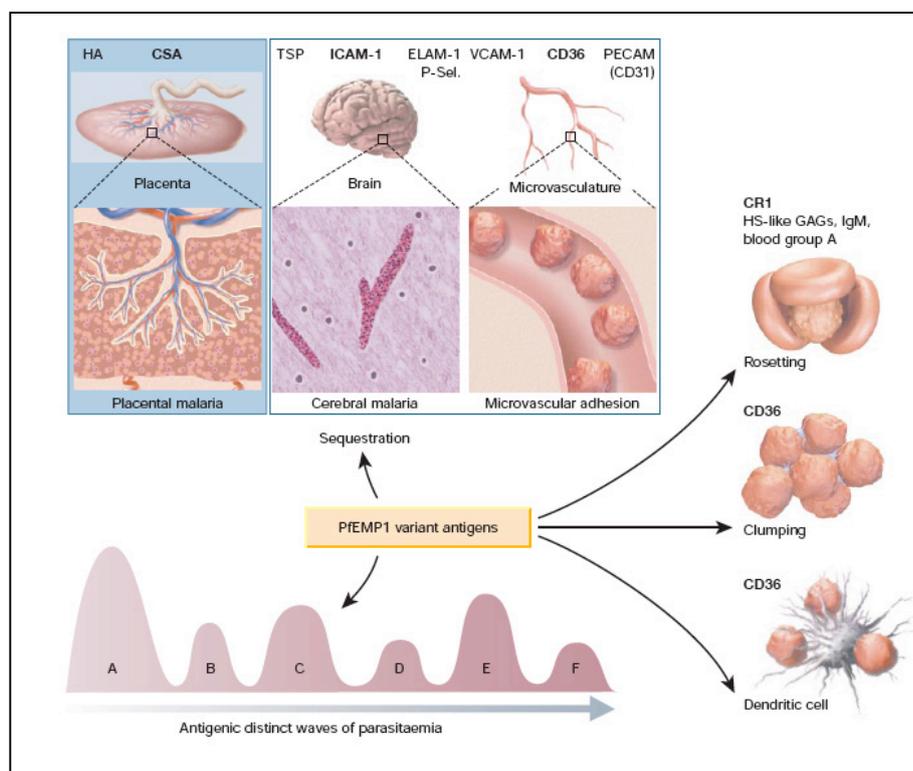


Figura 2. Mecanismos de patogênese mediados por PfEMP1. Acima, receptores reconhecidos por diferentes variantes de PfEMP1 em diferentes órgãos, levando à citoadesão; ao lado, adesão célula-célula mediada por PfEMP1; abaixo, ondas de parasitemia observadas em pacientes correspondem a diferentes variantes de PfEMP1 majoritariamente expressas na população (Miller *et al.*, 2002).

Além disso, PfEMP1 pode mediar outros mecanismos de patogênese tal como *rosetting* de hemácias infectadas e não infectadas, *clumping* de eritrócitos infectados e ligação a células dendríticas, causando atenuação da resposta imune. A adesão a diferentes tipos de receptores é mediada por diferentes tipos de PfEMP1, que são expressas clonalmente e estão sujeitas à variação antigênica, ou seja, um único parasita expressa um único tipo de PfEMP1 num dado momento (Miller *et al.*, 2002; Pierce and Miller, 2009; Scherf *et al.*, 2008). Antes que o sistema imune do hospedeiro possa produzir anticorpos contra a variante de PfEMP1 expressa na população e eliminar os eritrócitos infectados, alguns poucos parasitas passam a expressar uma nova

seqüência de PfEMP1, escapando assim da resposta imune e dando início a uma nova onda de parasitemia (ver figura 2).

1.2 Organização do genoma nuclear de *P. falciparum*

O genoma nuclear de *P. falciparum* contém ~ 23 Mb distribuídos em 14 cromossomos haplóides que variam de ~ 0.6 a 3.3 kb. Extremamente rico em AT (aproximadamente 80%), codifica cerca de 5300 proteínas, das quais apenas 40% apresentam homologia com proteínas conhecidas (Gardner *et al.*, 2002).

Os cromossomos de *Plasmodium* ssp. possuem regiões centrais sintênicas contendo sobretudo genes *housekeeping*, enquanto a maior parte dos genes que codificam fatores de virulência e proteínas exportadas para a membrana dos eritrócitos está localizada próxima às extremidades cromossômicas (Gardner *et al.*, 2002). Em *P. falciparum*, as extremidades cromossômicas são compostas de telômeros seguidos por uma região subtelomérica de estrutura conservada. Os telômeros são compostos por repetições GGGTT(T/C)A de 1650 bp em média na cepa 3D7, seguidos por uma região subtelomérica não codificante de 15-30 kb composta de por seis regiões conservadas denominadas *telomere-associated repetitive elements*, ou TAREs (Figueiredo *et al.*, 2002; Figueiredo *et al.*, 2000; Gardner *et al.*, 2002). As TAREs são classificadas entre TARE 1 a 6, sendo TARE 6 – também chamada de Rep20 (Oquendo *et al.*, 1986) – a mais longa de todas as TAREs, com tamanho total de 6 a 23 kb, dependendo do braço do cromossomo analisado (Figueiredo *et al.*, 2002).

Um aspecto bastante curioso – e único – é a organização do rDNA em *Plasmodium*. Ao contrário de outros eucariotos, que possuem diversas cópias de unidades rRNA em *tandem arrays*, *P. falciparum* possui apenas 7 unidades 18S-5.8S-28S rRNA distribuídas em diferentes cromossomos. Essas unidades de rRNA possuem seqüências diferentes e são classificadas, de acordo com a fase do ciclo de vida em que são expressas, em *asexual type*, ou *A-type* (duas unidades funcionais, localizadas nos cromossomos 5 e 7), e *sexual type*, ou *S-type* (duas unidades funcionais, localizadas nos

chromossomos 11 e 13 - Gardner *et al.*, 2002; McCutchan *et al.*, 1988; Waters *et al.*, 1995). As três unidades restantes de 18S-5.8S-28S rRNA não foram caracterizadas funcionalmente. Além disso, há também três genes de 5S rRNA, localizados em *tandem* no cromossomo 14 (Gardner *et al.*, 2002).

1.3 Controle molecular do desenvolvimento

Durante as ~48 horas de um ciclo celular da fase eritrocítica, *P. falciparum* passa por quatro estágios de desenvolvimento morfológicamente distintos: o anel, o trofozoíta, o esquizonte e o merozoíta (figura 3). Com exceção de diferenças fisiológicas mais evidentes, tais como os merozoítas serem especializados na invasão de eritrócitos e esquizontes na replicação de DNA, pouco se sabia das particularidades moleculares de cada fase.

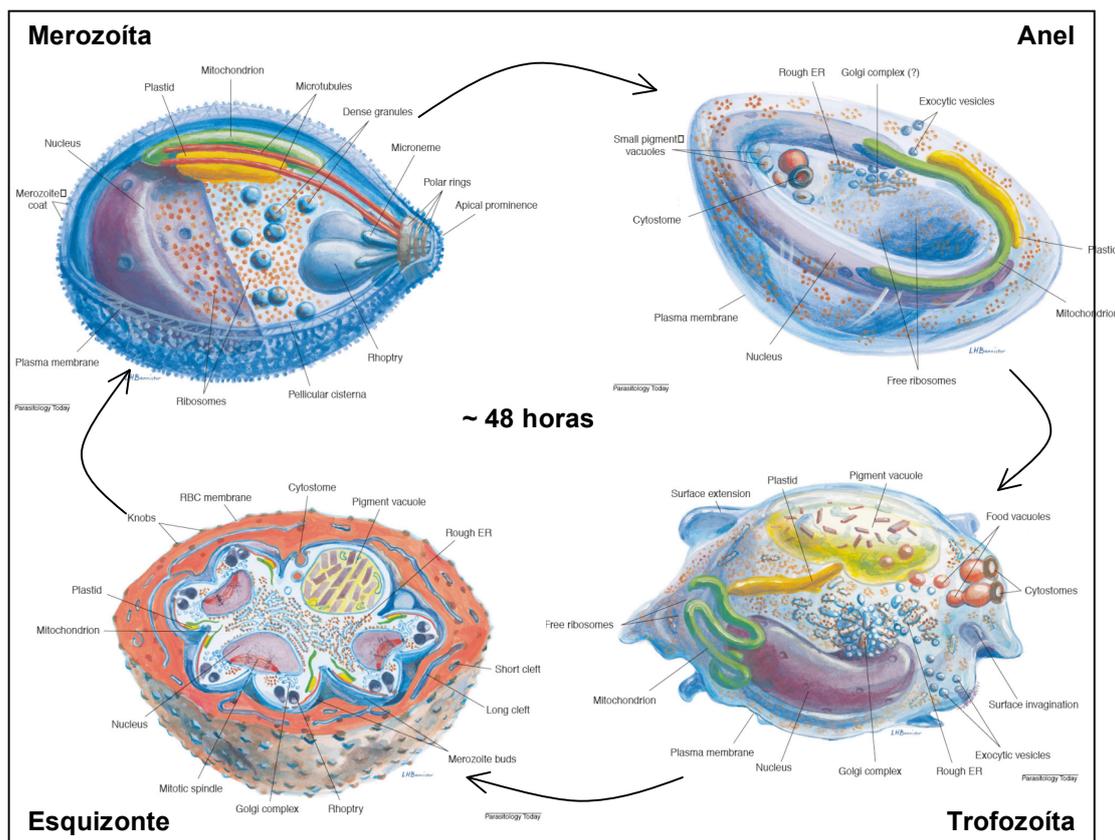


Figura 3. Características morfológicas dos quatro estágios de desenvolvimento de *P. falciparum* ao longo do ciclo eritrocítico. Note que o esquizonte é o único estágio representado dentro do eritrócito. Modificado de (Bannister *et al.*, 2000)

Em 2003, com a publicação do transcriptoma de *P. falciparum*, começou a surgir uma idéia mais clara dos eventos moleculares que governam o desenvolvimento do parasita ao longo do ciclo eritrocítico (Bozdech *et al.*, 2003; Le Roch *et al.*, 2003). Embora se tivesse uma idéia então de que alguns genes, incluindo genes *housekeeping*, eram regulados de maneira estágio-específica (Cheesman *et al.*, 1998; Delves *et al.*, 1990; Horrocks *et al.*, 1998; Horrocks *et al.*, 1996; Lanzer *et al.*, 1992a; Lanzer *et al.*, 1992b; Waters *et al.*, 1989; Wesseling *et al.*, 1989), os estudos de transcriptoma revelaram que este fenômeno é muito mais comum do que se pensava. Ao contrário do que ocorre em eucariotos superiores e leveduras, nos quais apenas cerca de 15% dos genes são periodicamente regulados, em *P. falciparum* mais de 75% dos genes expressos ao longo do ciclo eritrocítico são regulados de maneira estágio-específica. Este padrão de regulação da transcrição só é visto em organismos em fase de desenvolvimento, e portanto reforça a idéia de que um ciclo celular de *P. falciparum* equivale a um ciclo de desenvolvimento/diferenciação (Bozdech *et al.*, 2003; Le Roch *et al.*, 2003).

Ainda mais surpreendente foi a descoberta de que genes funcionalmente relacionados, sejam grupos de genes *housekeeping* ou grupos de genes envolvidos na evasão do sistema imune, são co-expressos, com um único pico de ativação durante o ciclo (figura 4). A ativação da transcrição dos grupos de genes relacionados ocorre *just-in-time*, isto é, pouco antes da necessidade de utilização das proteínas por eles codificadas; por exemplo, a transcrição dos genes que codificam proteínas envolvidas na invasão se inicia apenas nos esquizontes (Bozdech *et al.*, 2003; Le Roch *et al.*, 2003). Esse modo de ativação gênica foi chamado de.

Além disso, com exceção do *cluster* de genes do grupo SERA localizado no cromossomo 2, não se observou padrão de ativação estágio-específica em regiões cromossômicas contínuas, sugerindo que a ativação dos genes ocorre de maneira individualizada (Bozdech *et al.*, 2003).

Trabalhos subseqüentes demonstraram que a regulação periódica dos genes não é exclusiva do estágio eritrocítico: diversos genes expressos durante o estágio hepático e o desenvolvimento sexual (gametócitos) também são regulados ao longo do desenvolvimento (Silvestrini *et al.*, 2005;

Tarun *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2005). Um outro caso bastante atípico é a regulação das unidades *A-type* e *S-type* de rRNA: as duas unidades de *A-type*, A1 e A2, são expressas exclusivamente durante o ciclo eritrocítico, enquanto que as duas unidades *S-type*, S1 e S2, são transcritas exclusivamente em fases sexuais (McCutchan *et al.*, 1988; Waters *et al.*, 1989). Um estudo em *P. berghei* demonstrou que durante o ciclo eritrocítico uma parcela da população expressa também S1 e S2, e as frequências de parasitas expressando essas unidades coincidem com as frequências de gametocitogênese (Waters *et al.*, 1997). Portanto, a regulação estágio-específica da expressão gênica é um fenômeno extremamente comum, seja durante o ciclo celular ou durante o desenvolvimento do ciclo de vida.

1.4 Regulação da expressão gênica em *P. falciparum*

Apesar dos avanços obtidos com o sequenciamento do genoma do parasita (Gardner *et al.*, 2002) e com os estudos do transcriptoma (Bozdech *et al.*, 2003; Gunasekera *et al.*, 2007; Le Roch *et al.*, 2003; Silvestrini *et al.*, 2005; Tarun *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2005), os mecanismos moleculares da regulação estágio-específica dos genes de *P. falciparum* permanecem pouco conhecidos.

Os genes de *P. falciparum* possuem estruturas canônicas, contendo regiões 5' e 3' não-traduzidas, promotores bipartidos e íntrons e, ao contrário de tripanossomas, possuem transcrição monocistrônica (Horrocks *et al.*, 1998; Lanzer *et al.*, 1992b; Lanzer *et al.*, 1994).

O alto conteúdo de AT do genoma do *P. falciparum* (90% em média nas regiões não codificantes; Gardner *et al.*, 2002) frustrou a descoberta de seqüências reguladoras por métodos de bioinformática/filogenia clássicos baseados em seqüências reguladoras de outros organismos, com exceção da TATA *box* (Ruvalcaba-Salazar *et al.*, 2005). Contudo, evidência experimental acumulada por mais de uma década demonstrou que seqüências curtas e simples nas regiões promotoras exercem papel regulador na expressão gênica estágio-específica em *Plasmodium*. O primeiro motivo regulador putativo identificado foi o da região promotora do

gene que codifica a *glycophorin-binding protein* [GBP130; (Lanzer *et al.*, 1992b)]. Trabalhos subsequentes demonstraram que diversos outros genes também possuem em suas regiões promotoras seqüências suficientes para garantir a expressão estágio-específica de repórteres epissomais (Crabb and Cowman, 1996; de Koning-Ward *et al.*, 1999; Dechering *et al.*, 1999; Eksi *et al.*, 2008; Gunasekera *et al.*, 2007; Horrocks *et al.*, 1996; Lopez-Estrano *et al.*, 2007; Militello *et al.*, 2004; Olivieri *et al.*, 2008; Porter, 2002; Young *et al.*, 2008). Contudo, um estudo comparando as atividades do promotor *gbp130* epissomal e endógeno demonstrou que, ao contrário do gene endógeno, o promotor epissomal perde sua atividade estágio-específica, tornando-se constitutivamente ativo. Os autores atribuíram a perda de expressão estágio-específica à aparente mudança na estrutura dos nucleossomos no promotor epissomal e concluíram que fatores epigenéticos podem estar envolvidos na expressão estágio-específica em *Plasmodium* (Horrocks and Lanzer, 1999). Portanto, seqüências regulatórias podem comportar-se diferentemente quando removidas do seu contexto cromossômico, e o uso de promotores epissomais para estudo da expressão estágio-específica durante o ciclo eritrocítico deve ser considerado com certa cautela.

Assim como em diversos outros eucariotos, o genoma de *P. falciparum* codifica uma maquinaria basal de transcrição por RNA polimerase II (RNAPolII) e de fatores associados à transcrição [TAFs – (Callebaut *et al.*, 2005)]; contudo, não foram encontrados ortólogos de outros fatores de transcrição canônicos. Oposto à essa situação, os genes de *P. falciparum* possuem mais seqüências reguladoras em *cis* do que qualquer outro genoma analisado (van Noort and Huynen, 2006), levando os autores desse estudo a propor um modelo de regulação combinatória da expressão gênica em *P. falciparum*. Segundo este modelo, os poucos fatores de transcrição disponíveis interagem de maneira combinatória com os elementos reguladores em *cis* de forma a regular a expressão estágio-específica dos genes.

Entretanto, a paradoxal ausência de fatores de transcrição em *Plasmodium* foi desafiada pela identificação da primeira família de fatores de transcrição específica de apicomplexos, chamada de ApiAP2 (Balaji *et al.*, 2005). Em *P. falciparum*, os 26 membros desta família possuem um pequeno

motivo de ligação de DNA de integrase conservado, encontrado também na segunda maior família de fatores de transcrição específicos de plantas, *Apeta1a2*/fator de resposta ao etileno (AP2/ERF).

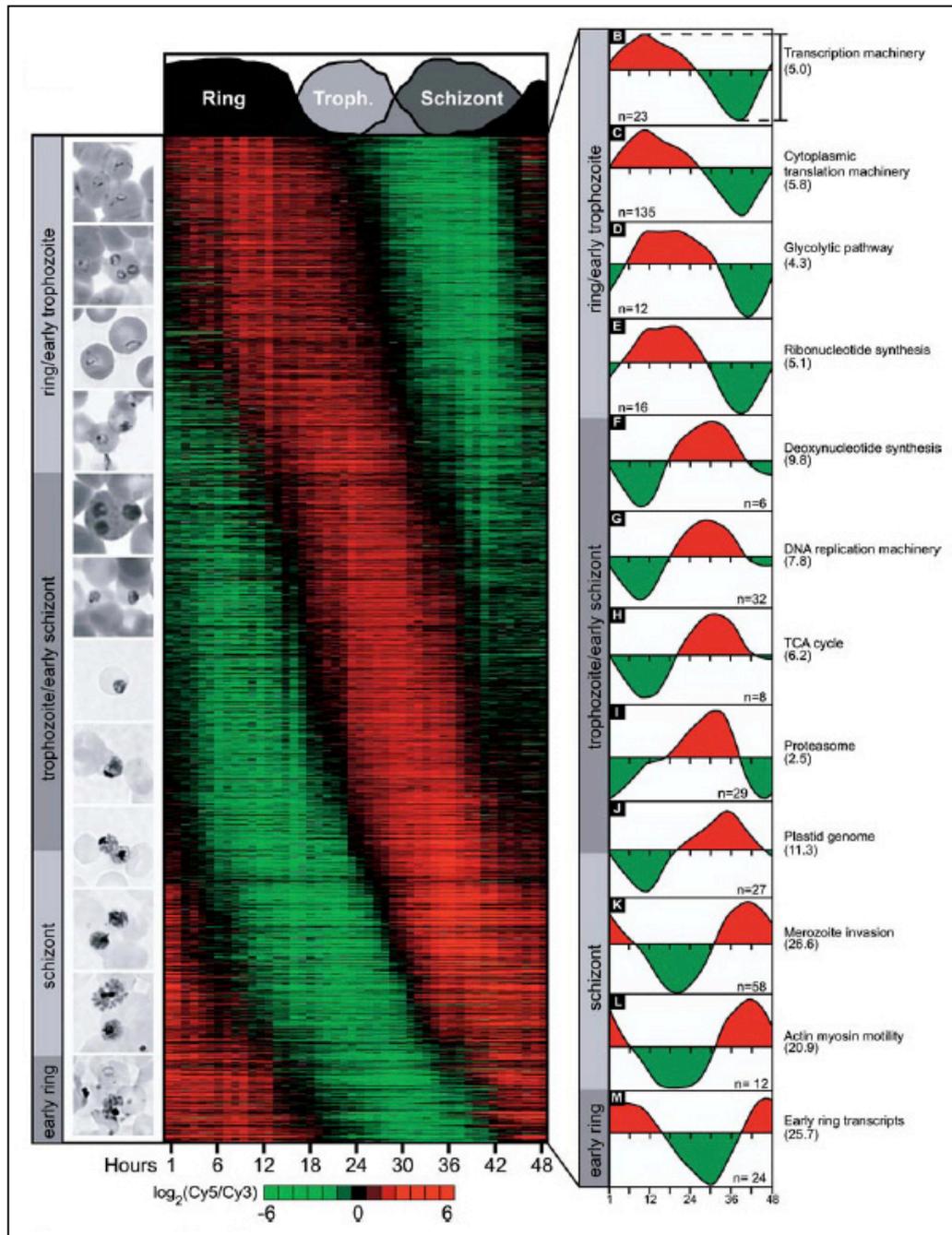


Figura 4. Transcriptoma do ciclo eritrocítico. Ao centro, um diagrama demonstrando a atividade transcricional de 2.712 genes ativado durante as 48 horas do ciclo eritrocítico, sendo que verde demonstra atividade abaixo da média e vermelho demonstra atividade acima da média; os genes foram dispostos ao longo do eixo y de acordo com a fase de ativação (correlacionada com as fases do parasita, mostradas à esquerda). À direita, um esquema mostrando grupos de genes funcionalmente correlacionados e que são ativados/desativados concomitantemente (Bozdech *et al.*, 2003).

A caracterização funcional de fatores ApiAP2 demonstrou que estes reconhecem motivos específicos localizados nas regiões 5' *upstream* de grupos funcionais de genes co-expressos, tanto no ciclo eritrocítico quanto em fases do ciclo sexual (De Silva *et al.*, 2008; Llinas *et al.*, 2008; Yuda *et al.*, 2009). Dado que tais motivos estão presentes apenas em genes co-regulados/co-expressos, especula-se que a família de fatores ApiAp2 tenha um papel importante na regulação da expressão estágio-específica em *Plasmodium*.

1.5 Formas alternativas de regulação da transcrição durante o ciclo eritrocítico

Evidências de estudos de bioinformática sugerem que *P. falciparum* possui um variado repertório de RNAs estruturais não codificantes (ncRNAs) que podem influenciar os padrões de expressão gênica. Em um dos estudos (Mourier *et al.*, 2008) foram identificados 33 ncRNAs expressos no ciclo eritrocítico, sendo que alguns são regulados de maneira estágio-específica. Outro trabalho encontrou diversos RNAs estruturais de *P. falciparum* que constituem componentes da maquinaria de transcrição em outros eucariotos (Chakrabarti *et al.*, 2007). Um terceiro estudo descreveu ncRNAs transcritos a partir das regiões centroméricas (Li *et al.*, 2008). Os autores propuseram um papel de regulação da estrutura da cromatina por esses ncRNAs, contudo essa hipótese ainda necessita ser validada.

RNA polimerase II (RNAPolIII) de *P. falciparum* transcreve grandes quantidades de RNA antisense de diversos *loci* genômicos, que parecem ser regulados de maneira estágio-específica (Militello *et al.*, 2005). A função desses RNAs é desconhecida, sobretudo porque o genoma de *P. falciparum* não codifica uma maquinaria conservada de RNAi (Militello *et al.*, 2008).

Análises em escala genômica demonstraram que as taxas de decaimento de mRNA aumentam drasticamente ao longo do ciclo eritrocítico. Na fase de anel, a meia-vida média dos mRNAs é de 9.5 min, enquanto que em esquizontes esse número sobe para 65 min (Shock *et al.*, 2007). Os autores desse estudo argumentaram que mecanismos de regulação pós-

transcricional podem ser importantes para genes expressos em esquizontes, e permitem um acúmulo de mRNA nesse estágio.

1.6 Controle epigenético da expressão gênica e genes *var*

Durante os últimos anos, ficou evidente que fatores epigenéticos exercem um papel no controle da expressão gênica em *P. falciparum*. Com a publicação do genoma do parasita, descobriu-se que, em contraste à aparente ausência de fatores de transcrição canônicos, *P. falciparum* possui uma maquinaria completa de proteínas de modificações e remodelagem de cromatina, sugerindo que modificações epigenéticas seriam um mecanismo fundamental da regulação da transcrição nesse parasita (Gardner *et al.*, 2002). A cromatina de *P. falciparum*, assim como a maioria dos eucariotos, está organizada em nucleossomos, compostos de um octâmero de duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4, envolvido por 147 pares de bases de DNA (Cary *et al.*, 1994). Contudo, o parasita não contém a histona H1, que sela o nucleossomo e ajuda a estabilizar a estrutura da cromatina (Miao *et al.*, 2006).

Grande parte do conhecimento funcional sobre a epigenética desse parasita veio dos estudos da família multigênica *var*, que codifica PfEMP1 (Baruch *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995; Su *et al.*, 1995). Há grande interesse no estudo da regulação dos genes porque a expressão de seus membros ocorre de maneira mutuamente exclusiva, isto é, num dado momento um único parasita expressa apenas um dentre os aproximadamente 60 membros da família. Os mecanismos moleculares que garantem a expressão mutuamente exclusiva dos genes *var* ainda não estão claros, mas uma grande variedade de estudos aponta para fatores epigenéticos.

A primeira evidência de que genes *var* seriam regulados por mecanismos epigenéticos foi demonstrada por Scherf e colaboradores. Neste estudo, os autores mostraram que o *switching* de genes *var* ocorre *in situ*, e a expressão mutuamente exclusiva é estabelecida independentemente de recombinação ou modificações de DNA, tal como metilação (Scherf *et al.*, 1998). Estudos subseqüentes focaram no papel que a estrutura da cromatina

exerce na regulação da expressão dos genes *var*. Foi demonstrado que o promotor do gene *var* ativo encontra-se hiperacetilado nas histonas H3 e H4, enquanto que os promotores dos genes silenciados estão associados à proteína *Silent information regulator 2*, ou PfSir2A, uma histona deacetilase (Freitas-Junior *et al.*, 2005; Merrick & Duraisingh, 2007). Acredita-se que PfSir2A leve a um estado de hipoacetilação da cromatina, tornando-a menos acessível à maquinaria de transcrição, causando o silenciamento dos genes hipoacetilados (Freitas-Junior *et al.*, 2005). O genoma do *P. falciparum* codifica dois parálogos de PfSir2, A e B, e a deleção de um dos parálogos resulta na abolição da expressão mutuamente exclusiva dos genes *var* (Duraisingh *et al.*, 2005; Tonkin *et al.*, 2009). Curiosamente, PfSir2A e PfSir2B controlam subgrupos independentes de genes *var*, de modo que juntas são capazes de silenciar todos os membros da família, e com exceção da família multigênica *rif*, que também está sujeita à expressão mutuamente exclusiva, PfSir2A e B não parecem ser importantes na regulação da expressão de outros genes (Tonkin *et al.*, 2009).

Desde a primeira associação do estado de acetilação de histonas com transcrição de genes *var*, novos estudos detalharam as modificações associadas com o gene ativo e os silenciados. Verificou-se que genes *var* inativos estão enriquecidos em histona H3 trimetilada na lisina 9 (H3K9me3), um marcador de heterocromatina em outros eucariotos, durante todo o ciclo eritrocítico. Já as modificações associadas com o gene *var* ativo são mais dinâmicas. No período em que o gene *var* é transcrito, na fase de anel, a região 5' *upstream* está enriquecida em H3K4me2, H3K4me3 e H3K9ac, sendo que esta última modificação é antagonista de H3K9me3 e está associada com cromatina ativa em outros eucariotos. Em trofozoítas, o gene *var*, que também é periodicamente regulado, deixa de ser transcrito, perdendo H3K4me3 e H3K9ac, sendo enriquecido para H3K9me3. Contudo, o gene continua enriquecido em H3K4me2, sugerindo que esta seja a marcação que diferencia o *var* ativo dos silenciados, mesmo quando o gene não é transcrito, e permite que esse mesmo gene volte a ser expresso num próximo ciclo celular, num estado *poised* (Chookajorn *et al.*, 2007; Lopez-Rubio *et al.*, 2007).

Contudo, as modificações de histonas não são exclusivas de genes *var* em *P. falciparum*. Um estudo caracterizou a histona acetilase PfGCN5 e demonstrou que H3K9ac é um marcador não apenas de genes *var* mas também de genes que possuem regulação estágio-específica ao longo do ciclo eritrocítico (Cui *et al.*, 2007). Estudos mais recentes sugeriram que H3K4me3 e H3K9ac não refletem simplesmente o estado transcricional dos genes expressos durante o ciclo eritrocítico, e que estes marcadores são regulados ao longo do ciclo celular (Salcedo-Amaya *et al.*, 2009). Além disso, H3K9me3 não está restrita apenas a genes *var* inativos mas também encontra-se enriquecida em outras famílias multigênicas implicadas em interações parasita-hospedeiro, como *rif* e *stevor*, restritas a regiões subteloméricas e em *clusters* internos nos cromossomos (Lopez-Rubio *et al.*, 2009; Salcedo-Amaya *et al.*, 2009). Recentemente, foi descrita a interação da *heterochromatin protein 1* de *P. falciparum* (PfHP1) com genes enriquecidos em H3K9me3, reforçando os argumentos de que tais regiões cromossômicas possam de fato estar organizadas em heterocromatina (Flueck *et al.*, 2009; Pérez-Toledo *et al.*, 2009).

A busca dos determinantes moleculares da variação antigênica não se restringe ao estudo das modificações da cromatina. Foi demonstrado que um promotor *var* dirigindo a expressão episomal de genes de resistência a drogas como blasticidina S ou pirimetamina é “contado” como um promotor de *var* endógeno e portanto leva ao silenciamento dos outros membros da família, mesmo na ausência de região codificante de PfEMP1 (Dzikowski *et al.*, 2007; Voss *et al.*, 2006; Voss *et al.*, 2007). O promotor episomal portanto é reconhecido como um promotor nativo e é transcrito da mesma maneira que um gene *var* endógeno, inclusive localizando na periferia nuclear (discutido adiante). Contudo, o promotor do gene *var* deve estar pareado com um segundo promotor ativo, localizado a *downstream* do gene de seleção, a fim de garantir a inclusão do promotor *var* episomal no mecanismo de contagem de genes *var* endógenos, e assim manter a expressão mutuamente exclusiva (Dzikowski *et al.*, 2007). O papel do promotor pareado seria mimetizar o íntron endógeno dos genes *var*, que foi implicado na regulação da expressão mutuamente exclusiva. Os genes *var* possuem uma organização gênica conservada, com dois éxons na região codificante

(Scherf *et al.*, 2008). O íntron localizado entre os éxons 1 e 2 possui seqüência conservada e apresenta atividade promotora durante a fase trofozoíta, quando dirige a síntese de “transcritos estéreis” a partir do éxon 2 dos genes *var* (Su *et al.*, 1995). Acredita-se que a atividade promotora do íntron esteja envolvida no silenciamento dos genes *var*, num mecanismo dependente da fase S do ciclo celular (Deitsch *et al.*, 2001; Frank *et al.*, 2006), mas o mecanismo molecular permanece desconhecido.

1.7 O papel da organização nuclear na expressão gênica

Tornou-se evidente que a arquitetura nuclear está correlacionada não só com a transcrição, uma das mais fundamentais funções do genoma, como também com todos os outros processos nucleares, como replicação e reparo de DNA ou processamento pós-transcricional de RNA (Misteli, 2007). Uma característica marcante é que esses processos são espacialmente compartimentalizados, ou seja, não ocorrem aleatoriamente por todo o núcleo, mas sim confinados a sítios definidos e exclusivos (Lamond and Spector, 2003).

A primeira evidência de que o núcleo do *P. falciparum* é espacialmente organizado foi a descoberta de que os telômeros e regiões subtelo méricas do parasita encontram-se organizados em *clusters* ancorados à membrana nuclear (Freitas-Junior *et al.*, 2000). Mais adiante, foi demonstrado que os genes *var* subtelo méricos silenciados estão associados aos clusters teloméricos (Duraisingh *et al.*, 2005; Ralph *et al.*, 2005; Voss *et al.*, 2006), mas a localização de genes *var* de regiões cromossômicas centrais silenciados tem sido debatida. Embora esse subgrupo de *var* esteja sempre associado à periferia nuclear, dois estudos apontam para a localização aleatória de genes *var* centrais nesta região do núcleo (Lopez-Rubio *et al.*, 2009; Ralph *et al.*, 2005), enquanto outro estudo sugere que *var* centrais silenciados também estão associados aos clusters teloméricos (Voss *et al.*, 2006).

Já o gene *var* ativo está associado a uma área transcricionalmente competente também localizada na periferia nuclear (Duraisingh *et al.*, 2005;

Howitt *et al.*, 2009; Lopez-Rubio *et al.*, 2009; Marty *et al.*, 2006; Ralph *et al.*, 2005). Contudo, não está claro se a ativação do gene *var* pode ocorrer associada ao *cluster* telomérico (Marty *et al.*, 2006; Voss *et al.*, 2006) ou requer translocação do gene *var* para uma área transcricionalmente ativa na periferia nuclear (Lopez-Rubio *et al.*, 2009; Ralph *et al.*, 2005). A periferia nuclear foi apontada como uma zona de silenciamento, contendo uma estrutura eletrondensa que sugere a presença de heterocromatina (Ralph *et al.*, 2005). Além disso, as proteínas de silenciamento PfSir2A, PfHP1 e PfOrc1 (*origin-of-recognition-complex 1*) encontram-se associadas à região perinuclear e aos *clusters* teloméricos (Flueck *et al.*, 2009; Freitas-Junior *et al.*, 2005; Mancio-Silva *et al.*, 2008b; Pérez-Toledo *et al.*, 2009). A localização exclusiva dessas proteínas no perinúcleo ocorre juntamente com a transcrição de genes *var* nesta região, sugerindo que esta possui ao menos um domínio de ativação gênica em meio a domínios de repressão.

Utilizando uma técnica de titulação de promotores, um estudo recente demonstrou que a maquinaria de transcrição de genes *var*, localizada nessa putativa região especializada da periferia nuclear, pode ser compartilhada por promotores das famílias multigênicas *rif*, *stevor* e *Pfmc-2TM*, e a expressão de um alto número de cópias de promotores *var* episomais leva não só ao silenciamento dos genes *var* como também de genes *rif*, *stevor* e *Pfmc-2TM* endógenos (Howitt *et al.*, 2009). Portanto, existe uma zona periférica transcricionalmente permissiva onde o gene *var* ativo é transcrito, mas esta zona, aparentemente, não é exclusiva para a transcrição de genes *var*.

A proposta de uma região nuclear especializada na transcrição de dados genes encontra paralelos em outros parasitas. Em *Trypanosoma brucei*, a existência de um compartimento de transcrição especializado na transcrição de *vsg* foi implicado na expressão mutuamente exclusiva dos membros dessa família multigênica (Navarro & Gull, 2001), enquanto que em *T. cruzi* existe um compartimento dedicado à transcrição de *spliced leader* RNAs (Dossin & Schenkman, 2005).

Com exceção dos genes *var* e dos *clusters* teloméricos, pouco se sabe sobre a organização nuclear de outros *loci* cromossômicos em *P. falciparum*. Com relação a compartimentos nucleares definidos por proteínas, o nucléolo é o melhor caracterizado até o momento. *P. falciparum* possui um único

nucléolo, periférico, que é definido pela proteína fibrilarina ou PfNop1 (Figueiredo *et al.*, 2005). PfSir2A, PfTERT – que codifica o componente protéico da telomerase – e PfOrc1 estão associadas ao nucléolo (Figueiredo *et al.*, 2005; Freitas-Junior *et al.*, 2005; Mancio-Silva *et al.*, 2008b). Contudo, não se sabe qual a função destas proteínas no nucléolo de *P. falciparum*, e a relação da organização nucleolar com a transcrição diferencial das diferentes unidades de rDNA permanece totalmente desconhecida.

Outras proteínas nucleares, assim como modificações específicas de histonas, todas associadas com ativação/repressão da transcrição, foram associadas a compartimentos nucleares discretos (Issar *et al.*, 2009; Pérez-Toledo *et al.*, 2009; Volz *et al.*, 2009). O fato de muitos desses compartimentos apresentarem topografias diferentes uns dos outros, demonstra que o núcleo de *P. falciparum* é altamente estruturado espacialmente. A caracterização funcional destes compartimentos, contudo, é necessária para o melhor entendimento da relação entre a organização nuclear e a transcrição.

1.8 A organização espacial da transcrição e a posição nuclear de genes co-regulados

A grande maioria dos estudos sobre a organização espacial da transcrição foi feita em células de mamíferos. Em HeLa, a incorporação em células permeabilizadas de 5'-bromouridina 5-trifosfato (BrUTP) em transcritos em enlongação demonstrou, pela primeira vez, que a transcrição encontra-se organizada em *foci* discretos espalhados por todo o núcleo (Iborra *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 1993; Wansink *et al.*, 1993). Estudos subsequentes demonstraram que esses *foci* continham diversas unidades de transcrição (uma unidade de transcrição corresponde, basicamente, a uma RNA polimerase engajada a um gene; Faro-Trindade & Cook, 2006a; Jackson *et al.*, 1998). Esses *foci* foram, então, denominados fábricas de transcrição, dado que são agregações espaciais de diversos genes e fatores associados a esse processo., de forma a aumentar a eficiência da transcrição (Cook, 1999). Foi ainda proposto que as fábricas de transcrição são

estruturas conservadas ao longo da evolução, encontrando um paralelo entre bactérias, nas quais o cromossomo circular formaria *loops* que favorecem a agregação espacial da moléculas de RNAPol. Em eucariotos, as fábricas de transcrição serviriam, ainda, como estruturas estabilizadoras dos *loops* formados por diversos cromossomos a fim de acessar às fábricas (Faro-Trindade & Cook, 2006b).

As fábricas de transcrição apresentam especialização, ao menos em relação ao tipo de RNA polimerase (RNAPol). Fábricas de RNAPolIII, que transcrevem mRNA, estão dispersas por todo o nucleoplasma, enquanto que RNAPolII, que transcreve rRNA, está restrita ao nucléolo (ver figura 5). Existe evidência também que as fábricas de RNAPolIII, que transcreve rRNA 5S e tRNAs, dentre outros RNAs estruturais pequenos, também é espacialmente restrita e diferenciada de fábricas de RNAPolIII (Carter *et al.*, 2008).

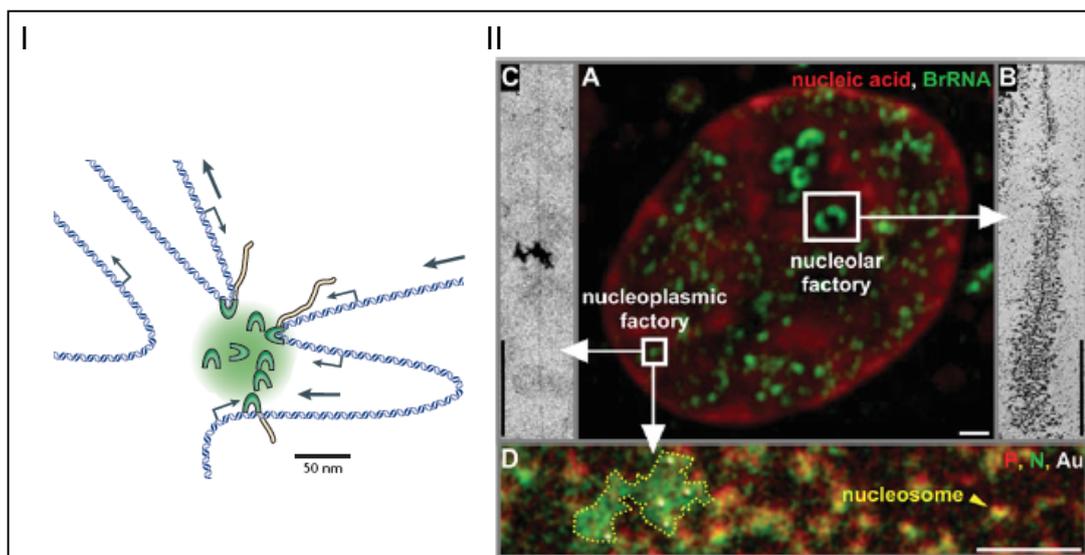


Figura 5. Organização da transcrição em fábricas. (I) Modelo de uma fábrica de transcrição. Em verde, fábricas de transcrição contendo RNA polimerases (em forma de ferraduras) associadas a *loops* cromossômicos (DNA em azul) e produzindo transcritos nascentes (fitas em amarelo). Barra, 50 nm (modificado de Sutherland & Bickmore, 2009). (II) Fábricas de transcrição (em verde) visualizadas *in situ* em HeLa por incorporação de BrUTP e visualização por imunofluorescência (A) e por espalhamento de fábricas de transcrição e visualização por microscopia eletrônica de transmissão (B e C). Note que fábricas de RNAPolII (nucleolares) contêm muitas mais unidades de polimerase engajadas no *template* (B) do que fábricas de RNAPolIII (nucleoplásmica, C). Barras, 1 μ m. (D) Detalhe de uma fábrica de RNAPolIII mostrando o que essas estruturas são ricas em nitrogênio (N), ou seja, em proteínas, e contêm BrRNA visualizado indiretamente com partículas de ouro (Au), mas são pobres em fósforo (P), ou seja, DNA. Barra, 100 nm (modificado de Carter *et al.*, 2008).

Evidências experimentais apontam para uma ainda maior especialização das fábricas de RNAPolIII. Um estudo recente (Xu & Cook, 2008) demonstrou que plasmídeos contendo promotores distintos são dirigidos a fábricas diferentes, dependendo do tipo de promotor. A presença de íntrons também foi importante na definição da fábrica ocupada por um dado plasmídeo.

A maioria dos estudos, contudo, focaram na dinâmica espacial de *loci* endógenos que são regulados ao longo do desenvolvimento. Os exemplos mais claros vêm do estudo dos genes de globina, expressos em células eritróides em fases embrionárias. Utilizando RNA *fluorescence in situ hybridization* (RNA-FISH) e *chromosome conformation capture* (3C), foi demonstrado por Osborne e colaboradores que o genes ativos de β -globina colocalizavam em alta freqüência com outros genes específicos de linhagem eritróides, ainda que esses genes estejam distantes do gene da β -globina (~ 25 Mb), embora no mesmo cromossomo. A colocalização espacial dos genes estava associada a fábricas de RNAPolIII. Contudo, esses dois *loci* não se encontram espacialmente associados quando silenciados (em células linfóides). Os autores concluíram que genes expressos em linhagens eritróides compartilham a mesma fábrica de transcrição (Osborne *et al.*, 2004). Diversos outros estudos correlacionaram a associação espacial em maior freqüência de diversos genes co-regulados ao longo do desenvolvimento e diferenciação (Brown *et al.*, 2006; Ling *et al.*, 2006; Simonis *et al.*, 2006; Spilianakis *et al.*, 2005; Würtele & Chartrand, 2006; Zhao *et al.*, 2006). Contudo, esses estudos não investigaram qual a associação dos *loci* co-regulados com fábricas de transcrição no momento em que estes estão ativos. Já em outro trabalho demonstrou-se que genes eritróides de humanos quando ativos não se apresentam em associação com fábricas de transcrição, mas sim com *speckles*, estruturas associadas com o processamento de RNA (Brown *et al.*, 2008).

Portanto, embora seja claro que, em mamíferos, diversos genes co-regulados ao longo do desenvolvimento estão em maior proximidade espacial quando ativos, a relação espacial dessas associações com fábricas de transcrição não foi bem definida e necessita ser melhor determinada.

2. Objetivos

Dada a importância da organização espacial da cromatina e da compartimentalização de proteínas nucleares para expressão gênica em *P. falciparum*, tivemos como objetivo principal, nesta tese, caracterizar de forma quantitativa e qualitativa a organização espacial global da transcrição nesse parasita. Buscamos, ainda, caracterizar a dinâmica espacial de genes ciclo eritrocítico funcionalmente relacionados e co-regulados de maneira estágio-específica, a fim de verificar como tais genes estariam posicionados no núcleo em relação a fábricas de transcrição.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- A. estabelecer e otimizar em *P. falciparum* a técnica de marcação de RNA nascente *in situ* por incorporação de BrUTP;
- B. desenvolver, em colaboração com grupo de *Image Mining* do Institut Pasteur Korea, um software para o estudo automatizado e quantitativo dos compartimentos de transcrição definidos por BrUTP em *P. falciparum*;
- C. analisar a arquitetura da transcrição em *P. falciparum* e investigar a presença de organização conservada desta ao longo do ciclo eritrocítico;
- D. avaliar a relação espacial dos compartimentos de transcrição com outros compartimentos descritos no núcleo de *P. falciparum*;
- E. utilizando *fluorescence in situ hybridization*, investigar, ao longo do ciclo eritrocítico, a posição de genes co-ativados, e se estes encontram-se em maior proximidade/possuem maiores índices de colocalização quando ativados.

3. Material e Métodos

3.1 Composição de soluções e tampões

- PBS: 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM tampão de fosfato pH 7,4 (Medicago # 09-8912-100)

- 1x TBE: 100 mM Tris-base, 90 mM ácido bórico, 1 mM EDTA (Invitrogen #15581-028)

- 20x SSPE: 3 M NaCl, 200 mM NaH₂PO₄, 20 mM EDTA, pH 7,4 (Invitrogen # 15591-027)

- 20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M citrato de sódio, pH 7,0 (Invitrogen #15557-044)

- Tampão de lavagem para incorporação de BrUTP: 150 mM sacarose, 20 mM glutamato de potássio, 3 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 10 µg/ml leupeptina

- Tampão de marcação para incorporação de BrUTP: tampão de lavagem adicionado de 50 mM creatina fosfato, 200 µg/ml creatina cinase, 120 U/ml RNasin (Promega #N2511) e, quando indicado, 200 µg/ml α-amanitina

- Solução de hibridização para *fluorescence in situ hybridization* (FISH): 50% formamida, 2x SSPE, 10% dextran sulfato, 250 µg/ml DNA de esperma de salmão

- Solução TNT: 0,5% Tween 20, 150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl

3.2 Meios de cultura e soluções de sincronização de *P. falciparum*

- Meio de cultura completo para *P. falciparum*: 100 µM hipoxantina de sódio, 16 µM timidina, 10% albumax I (Invitrogen #11020-039), 20 µg/ml gentamicina em RPMI 1640 (Invitrogen #22400)

- Soluções para sincronização: 5% sorbitol em água ultrafiltrada; 0.7% gelatina (Sigma # G9391) em RPMI 1640 (Invitrogen #22400)

Todas as soluções foram esterilizadas por filtração em membrana de poro de 0,2 µm.

3.3 Cultivo e sincronização de *P. falciparum*

Parasitas da cepa 3D7 foram utilizados neste trabalho. Os parasitas foram mantidos em meio de cultura completo contendo 3% de hematócrito (eritrócitos humanos tipo O+) e atmosfera de 1% O₂, 5% CO₂ e 94% N₂. Para manutenção rotineira das culturas, a parasitemia foi mantida entre 1 e 5%.

Durante os experimentos de incorporação de BrUTP e FISH (descritos abaixo), os parasitas foram submetidos a pelo menos um ciclo de sincronização em gelatina e sorbitol. Mais detalhadamente, parasitas maduros de culturas não sincronizadas foram centrifugados a 1000 x g por 2 min a temperatura ambiente. Cada volume de *pellet* foi ressuspenso em 9 volumes de 0,7% gelatina em RPMI e incubados a 37°C por 1 h. Em seguida, o sobrenadante contendo apenas parasitas maduros (idealmente, esquizontes a ~ 38 – 42 horas pós-invasão, ou hpi) foi coletado em um novo tubo, lavado uma vez em RPMI, e colocado em cultura com adição de eritrócitos frescos, conforme descrito acima. Vale ressaltar que, em nosso laboratório, o ciclo eritrocítico da cepa 3D7 dura aproximadamente 40 a 44 horas. Os parasitas nessas condições foram mantidos em cultura por 4 horas a fim de permitir a invasão de novos eritrócitos. Após esse período, a cultura foi centrifugada e tratada com 5% sorbitol (4 volumes de 5% sorbitol para 1 volume de *pellet*) por 5 min a 37°C. O *pellet* contendo apenas parasitas anéis, além de eritrócitos não infectados, foi recolocado em cultivo a 37°C até o momento do experimento. Este tratamento tem como objetivo lisar as formas maduras que não completaram a invasão, enquanto que as formas jovens (anéis de 0 a 4 hpi) foram preservadas pelo tratamento. A amplitude da idade dos parasitas nessas populações é de 4 horas e para simplificar, nos referimos daqui por diante à idade média da população: por exemplo, uma população contendo parasitas de 8 a 12 hpi é classificada como 10 hpi, e uma população contendo parasitas de 20 a 24 hpi é classificada como 22 hpi. Algumas vezes, tratamentos consecutivos de gelatina-sorbitol foram necessários por dois a três ciclos a fim de alcançar um alto grau de sincronização na população (em geral, > 95% dos parasitas apresentavam-se

na mesma fase do ciclo).

3.4 Marcação de RNA nascente *in situ* por incorporação de BrUTP

A incorporação de 5-bromouridina 5'-trifosfato (BrUTP) em *P. falciparum* foi adaptada do protocolo de (Dossin & Schenkman, 2005). A cultura sincronizada conforme descrito acima, foi coletada a 10 ou a 22 hpi, centrifugada a 1000 x g por 2 min a temperatura ambiente, e ressuspensa a 1×10^9 eritrócitos infectados/ml em tampão de lavagem gelado. Lisofosfatidilcolina (lisolecitina, Sigma #L4129) foi adicionada para uma concentração final de 0,01% e, após homogenização por inversão, os parasitas foram incubados por 5 min em banho de água e gelo. As células permeabilizadas foram centrifugadas a 2500 x g por 10 min a 4°C e lavadas 3 vezes em tampão de lavagem gelado. Em seguida, o *pellet* foi ressuspenso em tampão de marcação a 1×10^9 eritrócitos infectados/ml na presença ou ausência de 200 µg/ml de α -amanitina (daqui em diante referida apenas como α -amanitina, ficando portanto subentendida que a concentração utilizada foi a de 200 µg/ml) e incubados por 5 min a 37°C. Foram adicionados então a ambas preparações 2 mM ATP, 1 mM GTP, 1 mM CTP e 1 mM BrUTP (concentrações finais) e a marcação procedeu por 10 min a 37°C. Os parasitas foram então imediatamente fixados em 4% paraformaldeído em PBS pH 7,4 (4% PFA) a $1,25 \times 10^8$ parasitas/ml por 20 min a temperatura ambiente. Após a fixação, os parasitas foram centrifugados a 2500 x g por 10 min a 4°C, lavados uma vez em PBS e ressuspenso em PBS. A suspensão de parasitas foi colocada sobre uma lâmina de microscopia pré-coberta com 0,1% polilisina por aproximadamente 30 min em câmara úmida à temperatura ambiente para permitir a adesão dos parasitas ao vidro. Em seguida, os parasitas foram submetidos a ensaio de imunofluorescência (ver abaixo). Ocasionalmente, quando os parasitas foram preparados para aquisição de imagens em microscópio confocal (ver adiante), microesferas fluorescentes (Tetraspeck microspheres, Invitrogen #T7283) foram aderidas à lâmina, anteriormente aos parasitas, seguindo as orientações do fabricante.

3.5 Ensaio de imunofluorescência para proteínas nucleares

Todas as etapas subseqüentes foram realizadas em câmara úmida protegida de luz e mantida à temperatura ambiente. É de extrema importância evitar a secagem da preparação a fim de se preservar ao máximo a arquitetura nuclear. O excesso de parasitas depositados sobre as lâminas de vidro foi removido e então os parasitas aderidos foram permeabilizados com 0,1% Triton X-100 em PBS por 2 min, lavados 3 vezes em PBS e bloqueados por 30 min em 4% BSA em PBS pH 7,4 (4% BSA). Em seguida, o excesso de 4% BSA foi removido e os parasitas foram incubados com o anticorpo primário apropriado por 45 min.

Para detecção de BrRNA (RNA nascente marcado com BrU), foi utilizado o anticorpo monoclonal de camundongo anti-deoxiuridina (anti-BrdU) clone PRB1 (Invitrogen #A21300); para detecção de PfSir2A, foi utilizado um soro policlonal de coelho (Freitas-Junior *et al.*, 2005), gentilmente cedido pelo Prof. A. Scherf, Institut Pasteur, France; para detecção de PfNop1, foi utilizado um soro de cabra anti-fibrillarina humana, (Santa Cruz #SC-11335); para detecção de histona H4 acetilada (H4ac) e de trimetilação da lisina 79 da histona H3 (H3K79me3), foram utilizados soros policlonais de coelho (respectivamente, Millipore # 06-598 e Abcam # AB2621). Todos os anticorpos primários foram diluídos 1:50 (v/v) em 4% BSA, com exceção de anti-Hac, que foi diluído 1:100 (v/v).

Após incubação com anticorpos primários, os parasitas foram lavados em PBS 3 vezes e incubados com o anticorpo secundário apropriado e 5 µg/ml DAPI diluídos em 4% BSA por 30 min. Para detecção de anti-BrdU em séries confocais ou em combinação com a detecção de anti-PfSir2A, anti-H4ac e anti-H3K79me3, utilizamos soro anti-IgG de camundongo-Alexa 488 (Invitrogen #A11001), diluído 1:200 (v/v) para anti-BrdU e soro anti-IgG de coelho-Alexa 555 (Invitrogen #A21429) diluído 1:800 (v/v) para anti-PfSir2A, anti-H4ac e anti-H3K79me3. Para a detecção de anti-BrdU juntamente com anti-fibrillarina humana (anti-PfNop1), utilizamos soro anti-IgG de camundongo-Alexa 555 (Invitrogen #31570) e soro anti-IgG de cabra-Alexa 488 (Invitrogen #A21202), respectivamente, diluídos 1:200 (v/v). Após

incubação com anticorpo secundário e DAPI (4'6'-diamidino-2-phenylindole), os parasitas foram lavados em PBS 3 vezes. O excesso de PBS foi removido sem que a amostra secasse e as preparações foram montadas em Vectashield (Vector Labs #H-100) e seladas.

3.6 Preparação de sondas de DNA para *Fluorescence in situ hybridization* (FISH)

As sondas de DNA para FISH foram preparadas como descrito anteriormente (Freitas-Junior *et al.*, 2000). Para detecção de repetições teloméricas, foi utilizada uma sonda preparada a partir do telômero de *P. berghei* clonado em um vetor pBSII (Ponzi *et al.*, 1985), cedido gentilmente pela Prof. M. Ponzi, Istituto Superiore di Sanita, Itália. Para a detecção da repetição subtelomérica Rep20, foi utilizada uma sonda preparada a partir de um clone de Rep20 em um vetor pUC9 (Oquendo *et al.*, 1986), gentilmente cedido pelo Prof. A. Scherf, Institut Pasteur, France. O inserto de telômero foi isolado a partir da digestão de ~ 1µg do respectivo plasmídeo contendo o inserto de interesse com 40 U de *EagI* (NEB #R0505S), enquanto o inserto de Rep20 foi isolado por digestão de ~ 1 µg do plasmídeo 40 U de *HindIII* (NEB # R0104L) e 40 U de *EcoRI* (NEB # R0101L). Tanto para telômero quanto para Rep20, a reação foi realizada num volume final de 20 µl a 37°C por 2 h. Ao final, as enzimas de restrição foram inativadas por desnaturação a 65°C por 20 min. Os produtos de digestão foram fracionados em gel de 1% agarose em 0,5 x TBE e purificados utilizando o kit *QIAquick gel extraction* (Qiagen #28706) seguindo as orientações do fabricante. A concentração de inserto obtida ao final do procedimento foi quantificada por absorbância a 260 e 280 nm em um espectrofotômetro.

Em seguida, 1 µg de cada inserto foi utilizado como molde para marcação de sonda de FISH utilizando-se os kits *Fluorescein-High Prime* (Roche #1 585 622) e *Digoxigenin-High Prime* (Roche #1 585 606) conforme as instruções do fabricante. Ao fim da marcação, o DNA foi precipitado por LiCl/etanol. Brevemente, 2,5 µl de 4 M LiCl e 75 µl de 100% etanol resfriado a - 20°C foram adicionados à mistura contendo o DNA marcado. As amostras

foram incubadas à – 70°C por 2 h para precipitação do DNA, e em seguida centrifugadas a 13000 x g a 4°C por 15 min. O sobrenadante foi removido e o *pellet* foi lavado com 50 µl de 70% etanol gelado e seco ao ar. O *pellet* de DNA foi diluído em 30 µl de água ultrafiltrada e autoclavada.

As sondas de telômero foram marcadas com digoxigenina para os experimentos envolvendo análise automatizada de imagem em 3D e para quantificação da distribuição nuclear dos *clusters* teloméricos (figuras 16 a 18), e com fluoresceína na análise de colocalização de sinais de telômero e Rep20 (figura 19). As sondas de Rep20 foram apenas marcadas com digoxigenina.

3.7 Fixação de parasitas para FISH

Parasitas foram preparados de duas maneiras diferentes para FISH. Em ambos os casos, as lâminas foram limpas com metanol e secas antes da deposição do parasita. Em todos os experimentos, ambos processos de fixação foram realizados em paralelo utilizando populações sincronizadas (~ 10 hpi), a fim de minimizar a variação em tamanho e forma de núcleo para núcleo devido à idade de desenvolvimento (hpi) do parasita. Salvo indicação em contrário, todos os procedimentos foram realizados em temperatura ambiente.

No primeiro protocolo, denominado P1 e correspondente ao FISH inicialmente estabelecido (Freitas-Junior *et al.*, 2000), a cultura de *P. falciparum* foi lavada em PBS e espalhada sobre uma lâmina de vidro para obtenção de uma monocamada de células. As lâminas foram secas à temperatura ambiente por 16 ~ 20 h em câmara seca (contendo sílica-gel) e, posteriormente, fixada por 15 min em 4% PFA em câmara úmida. Os parasitas foram então lavados 3 vezes em PBS e reservados para FISH (ver adiante).

No segundo procedimento, denominado protocolo P2, um volume de *pellet* de cultura sincronizada foi ressuspenso em 9 volumes de 0,15% saponina em PBS gelado e a suspensão foi homogenizada por inversão e incubada em banho de gelo por 5 min para permitir lise total dos eritrócitos.

Em seguida, os parasitas foram centrifugados a 2500 x g por 10 min a 4 ° C, lavados duas vezes em PBS gelado, e fixados a 5 x 10⁸ parasitas/ml em 4% PFA por 16 ~ 20 h a 4°C.

3.8 Protocolo de FISH

FISH foi realizado conforme relatado (Freitas-Junior *et al.*, 2000; Mancio-Silva *et al.*, 2008a) com pequenas modificações. Durante todas as etapas, a secagem de parasitas foi evitada. Resumidamente, parasitas preparados por P1 e P2 foram permeabilizados com 0,1% Triton X-100 em PBS por 5 min seguido de 3 lavagens em PBS. Em seguida, ambas as preparações foram equilibradas em solução de hibridização em câmara úmida por 30 min a 37°C. Em paralelo, as sondas de FISH foram diluídas na concentração adequada em solução de hibridização e submetidas à desnaturação a 95° C por 10 min, sendo em seguida imediatamente imersas em em banho de gelo por 5 min. O excesso de solução de hibridização foi removido dos parasitas P1 e P2 e as sondas desnaturadas foram então aplicadas sobre as amostras. As lâminas foram seladas com molduras de plástico e desnaturadas a 80°C por 30 min, seguido de hibridização por ~ 16 a 20 h a 37 ° C.

Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em 50% formamida/2x SSC por 30 min a 37°C, seguido das seguintes lavagens a 50°C: 1x SSC, 15 min; 2x SSC, 15 min, e 4x SSC, 15 min. As lâminas foram transferidas para uma câmara úmida à temperatura ambiente e foram bloqueadas com 4% BSA por 30 min, seguido de incubação com soro anti-digoxigenina, obtido em camundongo (Sigma #D8156), diluído 1:300 em 4% BSA por 45 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas com solução TNT por 10 minutos e incubadas com soro anti-IgG de camundongo-Alexa 555 (Invitrogen #31570) por 45 min. As lâminas foram lavadas em solução TNT e as preparações foram montadas com Vectashield contendo DAPI. A partir deste momento, as amostras preparadas por P1 ou P2 e submetidas a FISH serão referidas como P1 e P2-FISH.

3.9 Aquisição de imagens

Imagens bidimensionais foram obtidas através de microscópio Nikon Eclipse 90i equipado com objetiva de óleo de imersão 100x/1.4 PlanApoVC e câmera DS-Nikon QiMc, controlada pelo software NIS-Elements AR. As imagens foram adquiridas de modo que os valores de intensidade dos pixels permanecessem entre 0 e 255 (ou seja, sem saturação do sinal) a partir da utilização da função de autoexposição combinada com LUTs, disponível no software NIS-Elements. Imagens tridimensionais (séries Z) foram adquiridas em um microscópio confocal Leica TCS SP2 AOBS equipado com objetiva 63x/HCX 1.4 PL Apo lbdBL de imersão a óleo. O diafragma foi ajustado para 1,00 *airy* e os dois canais foram adquiridos simultaneamente por dois fóton-multiplicadores (PMTs) independentes (DAPI-Alexa 555), ou em seqüência por PMTs independentes (DAPI-Alexa 488). Para detecção de sinal de DAPI, foi utilizado um laser diodo de 405 nm e a emissão foi adquirida em 415-485 nm. Para detecção de sinal de BrRNA indiretamente marcado por Alexa488, foi utilizado laser de argônio com emissão a 488 nm e a emissão foi adquirida em 515-570nm. Um laser verde DPSS foi usado para excitação de estruturas indiretamente marcadas por Alexa 555 a 561 nm, sendo a emissão neste caso detectada em 570-645 nm. Cada “fatia” da série Z era composta pela média de 16 *frames* de 512 x 512 pixels, 8 bits, com o tamanho do voxel (isto é, um pixel tridimensional) correspondente 58x58x122 nm. Após a aquisição, imagens 2D e 3D foram montadas e tratadas para a remoção do fundo (*rolling ball radius* 50) e para realce do contraste com o software ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004).

3.10 Análise automatizada de imagens

3.10.1 Correção de artefatos

A análise automatizada do núcleo foi desenvolvida a partir de modificações do método descrito em Dossin *et al.*, 2008. Em nossa aplicação, um importante nível de precisão é necessário para a detecção e

localização de sítios de síntese de RNA nascente dentro do núcleo do parasita. Para aumentar a relevância do modelo de processamento de imagem, temos de adquirir imagens com uma relação sinal/ruído (*signal-to-noise ratio*, SNR) o mais alto possível, sobretudo devido ao baixo nível de fluorescência obtido quando se marca as diminutas estruturas nucleares de *P. falciparum*. Decidimos otimizar o SNR aumentando o número de imagens em Z (“fatias”) que são somadas para extração da média de intensidade, que irá assim compor a “fatia” final (esse procedimento bastante comum é normalmente chamado de *frame averaging* em microscopia confocal e é determinado durante o processo de aquisição da imagem). No nosso caso, as “fatias” Z são compostas, cada uma em média de 16 fatias. Embora esse recurso aumente a SNR, está associado ao desvantajoso aumento do tempo de aquisição de imagem, o que levou, em nosso caso, a um movimento XY não intencional do objeto ao longo do eixo Z da série confocal. Esta “deriva lenta” pode induzir detecções falsas de sítios de transcrição e do sinal nuclear. Para superar esta desvantagem, propusemos colocar microesferas fluorescentes como referências internas na preparação biológica (ver item 3.4). Essas esferas são utilizadas para correção da moção indesejável do objeto ao longo do eixo Z a partir da aplicação de um algoritmo específico de correção de moção, desenvolvido especialmente para esta finalidade (Dorval *et al.*, 2009). Esse algoritmo permite a reconstrução da imagem em 3D com precisão, eliminando não apenas a moção indesejada mas também eventuais artefatos causados por mal alinhamento dos canais e aberrações cromáticas. A aplicação desse algoritmo é um pré-requisito para a detecção do núcleo e dos sítios de incorporação de BrUTP.

3.10.2 Detecção automatizada (segmentação) do núcleo de *P. falciparum*

A segmentação dos núcleos foi baseada em um processo semi-automático. Durante a primeira etapa do processo, o usuário selecionou uma região de interesse (ROI) que contém o núcleo do parasita escolhido para análise (ver figura 6A) e em seguida, foi aplicado ao núcleo selecionado um algoritmo de *thresholding* automático denominado *K-means clustering*. Foi

utilizado uma versão de duas classes que agrupa a intensidade dos voxels, classificando-os em sinal (núcleo) ou *background* baseado no método de *nearest neighbors*, levando em consideração a intensidade dos 6 outros voxels circundado um dado voxel “A”, para determinar a probabilidade de “A” ser sinal ou *background*. Após a classificação de todos os voxels analisados, o núcleo foi segmentado e projetado virtualmente por uma “malha” (*mesh*) 3D, que foi por sua vez gerada pelo algoritmo *marching cube* levando-se em consideração as diferentes resoluções em XY e em Z (figura 6B). Para remoção de possíveis artefatos gerados por ruído, a “malha” foi filtrada por um filtro tipo *kernel smoothing* gaussiano. Essa etapa atribui maior certeza à segmentação nuclear e permitiu determinar o centro e o volume do núcleo, além de permitir a rejeição de potenciais detecções falsas de estruturas nucleares, como sítios de síntese de RNA nascente ou telômeros, que venham a localizar fora da “malha” nuclear.

3.10.3 Detecção automatizada de sítios de síntese de RNA (e de outras estruturas nucleares, como clusters teloméricos)

Em termos de análise de imagem, os sítios de síntese de RNA como vistos por microscopia óptica podem ser definidos como objetos tridimensionais “borrados”, cujos raios são diretamente proporcionais à intensidade. Tais objetos podem ser identificados, ainda, pela curvatura gaussiana altamente positiva, detectada como a máxima local da curvatura após convolução com um *kernel* gaussiano, determinado empiricamente a 2 μm . Usando o método de diferenças finitas, um mapa da curvatura gaussiana foi então computado em 3D, e em seguida as curvaturas máximas locais foram definidas como sítios de transcrição (ou como *clusters* teloméricos, no caso de detecção automatizada de sinais de FISH). O mapa de curvatura foi sobreposto sobre a “malha” nuclear, permitindo a determinação da posição radial de cada sítio de transcrição no núcleo (figura 6C e D). A intensidade dos sítios foi medida e normalizada baseado no ganho do PMTs utilizado durante a aquisição.

A fim de extrair dados estatísticos relevantes e consistentes sobre a distribuição espacial dos sítios de transcrição dentro dos núcleos, as

distâncias dos sítios em relação ao centro do núcleo foram normalizadas. Resumidamente, o núcleo elipsóide foi projetado em uma esfera de raio definido como 1, e as posições dos sítios foram projetadas e relativizadas em relação a este raio. Em seguida, definimos três zonas nucleares concêntricas de igual volume, sendo que todas possuem a mesma probabilidade de conter um dado sítio de transcrição (figura 6F). Esse mesmo cálculo foi aplicado para definir 3 regiões concêntricas de superfícies iguais na análise semi-automatizada da posição de *clusters* teloméricos em 2D (figura 18).

3.10.4 Análise automatizada bidimensional da deformação nuclear

A deformação de núcleos submetidos a P1- ou P2-FISH foi determinada pela quantificação do índice de circularidade dos núcleos. Após a seleção do objeto de interesse na imagem 2D, o núcleo foi segmentado utilizando o método *K-means*. Os pontos de contorno do objeto foram extraídos e usados para calcular a circularidade C utilizando a seguinte equação: $C = (\text{Área} \cdot 4\pi) / (\text{Perímetro})^2$. Esse valor foi maximizado a 1 em um círculo e foi mais baixo em objetos menos compactos.

3.11 Análise da distribuição radial dos *clusters* teloméricos

O software NIS-Elements AR version 3.0 foi empregado para medir de forma semi-automatizada o raio de núcleos em 2D e a distância entre o centro de um sinal de *cluster* telomérico e o centro do núcleo. O raio de cada núcleo foi extraído após a determinação de uma circunferência ao redor do sinal de DAPI. Ao total, 50 núcleos de P1- e P2-FISH, cada, foram analisados. Um valor médio do raio nuclear foi computado para cada população. A distância de cada *cluster* telomérico ao centro do núcleo foi medida e normalizada em relação ao raio nuclear médio da população. A posição de cada *cluster* foi então classificada em uma das 3 zonas nucleares concêntricas de áreas iguais (figura 6F).

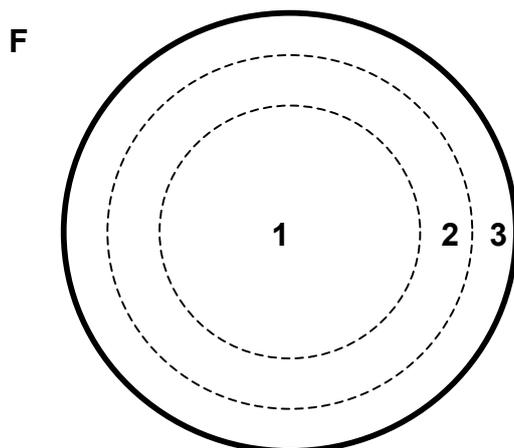
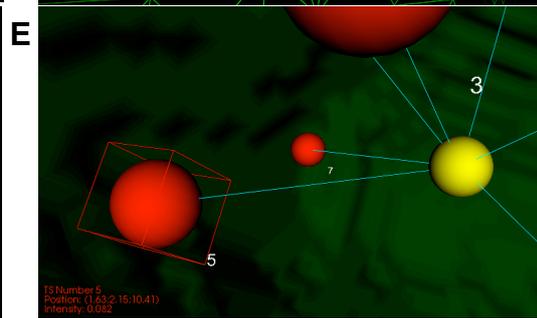
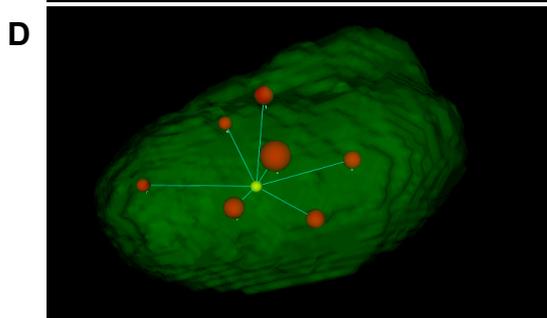
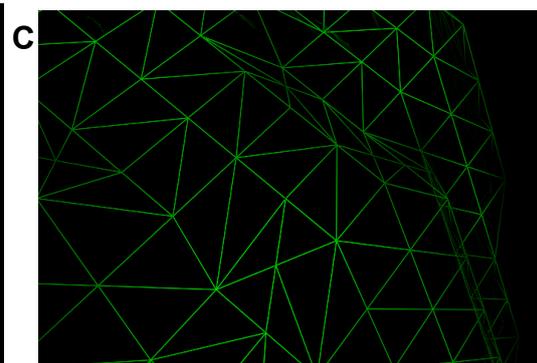
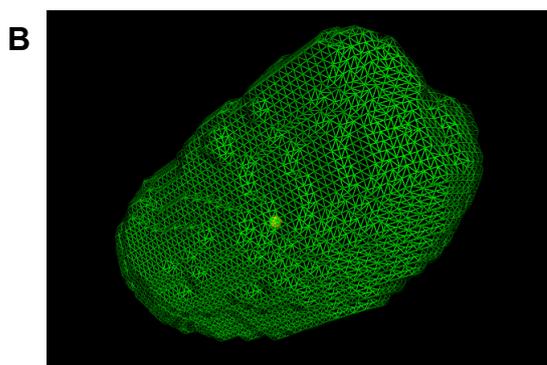
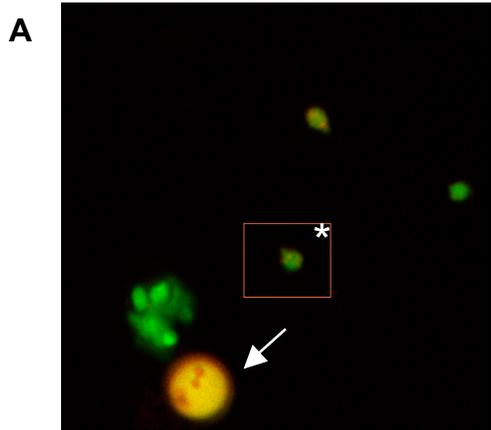
3.12 Análise da colocalização de sondas de telômero e Rep20 em P1- e P2-FISH

Para determinar os índices de colocalização entre sinais teloméricos e de Rep20 em FISH com as duas sondas, os sinais de telômero e Rep20 foram independentemente identificados e contados, e em seguida analisados para 3 possíveis tipos de colocalização, normalizados por Rep20 (cujos sinais foram encontrados em menor quantidade). Colocalização total foi determinada quando dois sinais telômero/Rep20 apresentavam mais de 80% de sobreposição; colocalização parcial foi determinada quando dois sinais apresentavam sobreposição de 20 a 80%; e ausência de colocalização foi determinada quando houve menos de 20% de sobreposição entre os sinais. Sinais localizados “fora” do sinal de DAPI só foram considerados quando havia uma sobreposição mínima do sinal do DAPI e da sonda de FISH.

3.13 Análises estatísticas

Testes *t* não pareados foram realizados no software *GraphPad Prism* versão 4.03 (San Diego, CA, EUA, www.graphpad.com). Valores bilaterais de *p* menores que 0.05 foram considerados significativos.

Figura 6. Detecção automatizada de estruturas nucleares. (A) Exemplo da seleção de núcleos, feita manualmente pelo usuário em uma série Z confocal (*). A seta aponta para uma microesfera fluorescente utilizada na correção da moção e aberrações físicas da imagem. (B) Núcleo “virtual” gerado a partir da segmentação automatizada do núcleo selecionado em A. (C) Detalhe da malha utilizada para construção do núcleo durante processo de segmentação. (D) Determinação da estruturas subnucleares (no caso, sítios de síntese de RNA marcados por BrUTP) e posicionamento espacial das mesmas no núcleo. As esferas vermelhas representam sítios de transcrição, e a esfera amarela representa o ponto central do núcleo. A distância radial entre os sítios de transcrição e o ponto central é visualizada por retas azuis. (E) Detalhe dos sítios de transcrição. Cada sítio é identificado por um número. As posições radiais dos sítios, bem como sua intensidade, são fornecidas. Note que o tamanho da esfera vermelha que representa o sítio é proporcional à intensidade do mesmo. (F) Esquema da divisão do núcleo em três áreas concêntricas de igual volume. O mesmo tipo de divisão foi aplicado para cálculos de distribuição nuclear em 2D.



4. Resultados e Discussão

4.1 Estudos *in situ* da síntese de RNA nascente mostram que transcrição é organizada em fábricas em *P. falciparum*

A arquitetura da transcrição pode ser visualizada *in situ* pela incorporação de nucleotídeos modificados, tais como 5-bromouridina 5'-trifosfato (BrUTP) em células permeabilizadas. Dado nosso interesse em estudar a organização espacial da transcrição em *P. falciparum*, nós padronizamos a técnica de incorporação de BrUTP para este parasita. Esta técnica foi de difícil execução em *P. falciparum* pois, dentre outros fatores, o parasita é extremamente sensível à permeabilização, além de possuir um núcleo bastante pequeno (cerca de 1 a 2 μm de diâmetro), dificultando a visualização de estruturas subnucleares discretas tais como sítios de transcrição, o que demanda a utilização de microscópios óticos de alta resolução. Vale também ressaltar que tentamos padronizar a incorporação de bromouridina (BrU) *in vivo* mas *P. falciparum* em cultura não incorporou, ao menos em níveis detectáveis por imunofluorescência, BrU no RNA nascente. Supomos que esse resultado se deva ao fato que apicomplexos somente sintetizam pirimidinas *de novo* e raramente recuperam tais bases do meio de cultura (de Koning *et al.*, 2005).

Assim como em mamíferos, a transcrição em *P. falciparum* está organizada em estruturas pontuadas espalhadas por todo o núcleo, denominadas de fábricas de transcrição (figura 7). A incorporação de BrUTP ocorre especificamente no RNA nascente (referido a partir daqui como BrRNA, para indicar que cada U foi substituída por BrU), como demonstra a inibição quase total da marcação por 200 $\mu\text{g/ml}$ de α -amanitina, um inibidor de RNA polimerases que nesta concentração inibe especificamente RNAPolIII mas não RNAPolI (Militello *et al.*, 2005) .

Acredita-se que a periferia nuclear de *P. falciparum* seja primariamente uma zona de silenciamento dado que esta é composta por uma estrutura eletrondensa semelhante à heterocromatina (Ralph & Scherf, 2005).

Contudo, a nossa análise inicial sugeriu que as fábricas de transcrição estão distribuídas por todo o núcleo, inclusive na periferia. Além disso, surpreendentemente observamos um número bastante reduzido de fábricas, na ordem de uma dezena por núcleo, enquanto que em mamíferos o número de fábricas varia de centenas a milhares por núcleo (Faro-Trindade & Cook, 2006a; Jackson *et al.*, 1998; Osborne *et al.*, 2004).

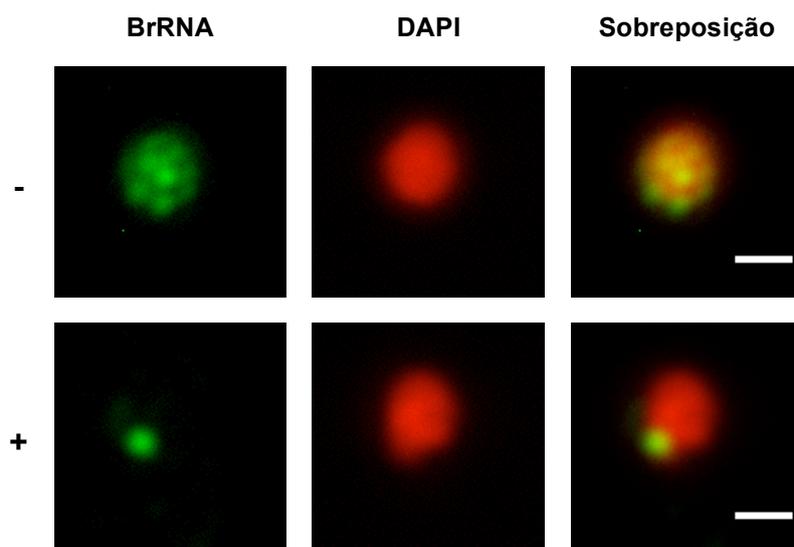


Figura 7. A transcrição é organizada em estruturas pontuadas e dispersas por todo o núcleo em *P. falciparum*. RNA nascente de parasitas da fase anel foi marcado com BrUTP (BrRNA, em verde) e visualizados por ensaio de imunofluorescência, conforme descrito em Material e Métodos. O DNA foi marcado com DAPI (em vermelho). Os sinais “-” e “+” indicam que a incorporação de BrUTP ocorreu na ausência ou presença, respectivamente, de 200 $\mu\text{g/ml}$ de α -amanitina. Barra, 1 μm .

4.2 A análise automatizada de imagem em 3D indica que fábricas de transcrição são estruturas dinâmicas

A fim de caracterizar quantitativamente o número e a distribuição de fábricas no núcleo do parasita, nós desenvolvemos, em colaboração com o Image Mining Group do Institut Pasteur Korea, um software para análise automatizada destas estruturas em imagens 3D adquiridas em microscópio confocal (figura 6 A-E). A utilização de análise automatizada de estruturas subnucleares permite, dentre outras vantagens, uma detecção objetiva e não enviesada do objeto estudado (Shiels *et al.*, 2007; Dossin *et al.*, 2008).

O software desenvolvido permite a quantificação de fábricas de transcrição a partir da identificação de picos locais de intensidade (curvatura) no sinal de BrRNA em séries confocais 3D. Além disso, o software é capaz de determinar a posição radial e a intensidade de cada uma das fábricas em um dado núcleo, conforme descrito em Material e Métodos.

Utilizando populações sincronizados, adquirimos séries Z confocais de parasitas marcados por BrUTP em duas fases distintas do ciclo eritrocítico: anel (10 horas pós-invasão, ou hpi) e trofozoíta jovem (22 hpi – figura 8). Inesperadamente, o perfil das fábricas de transcrição mostrou-se visivelmente distinto nestas duas fases: de maneira geral, parasitas a 10 hpi apresentaram fábricas localizadas em sítios discretos e praticamente individualizados, enquanto que a 22 hpi geralmente as fábricas apresentaram-se justapostas e menos individualizadas, com o sinal de BrRNA algumas vezes irradiando das fábricas para todo o nucleoplasma. Dado que BrRNA não é capaz de deixar os sítios de transcrição (Iborra *et al.*, 1998), concluímos que todo o sinal detectado corresponde a fábricas de transcrição e não a outros sítios de processamento pós-transcricional de RNA.

A análise automatizada das fábricas de transcrição mostrou que o número de fábricas também varia entre parasitas 10 e 22 hpi (tabela 1): a 10 hpi havia mais fábricas, em média 9 por núcleo, enquanto a 22 hpi havia em média 6 fábricas apenas. Esta diferença mostrou-se estatisticamente significativa ($p < 0.0001$).

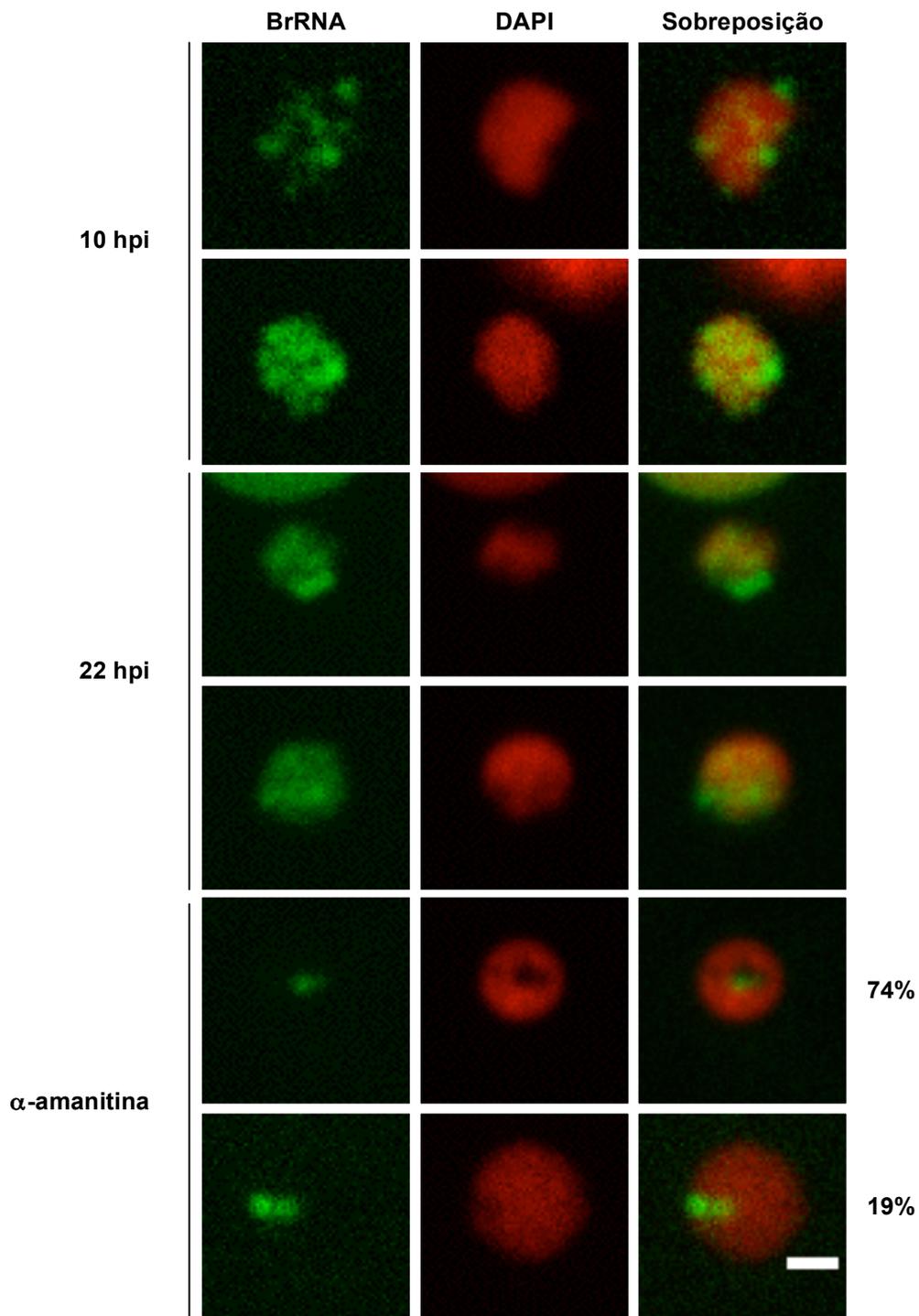


Figura 8. Perfil de transcrição em diferentes fases do ciclo de vida. Transcrição total detectada por marcação de RNA nascente *in situ* com BrUTP (BrRNA, em verde) em parasitas a 10 hpi (duas fileiras superiores), 22 hpi (fileiras intermediárias) e a 22 hpi na presença de 200 μ g/ml de α -amanitina (fileiras inferiores). DNA marcado com DAPI (em vermelho). Neste último caso, 74% da população apresenta apenas uma fábrica de transcrição, enquanto 19% apresenta duas fábricas. Barra, 1 μ m.

É importante ressaltar que embora não possamos saber o número definitivo de fábricas existentes nos diferentes estágios do ciclo eritrocítico, devido sobretudo aos limites de resolução da microscopia ótica, nosso método automatizado de detecção utiliza-se dos mesmos parâmetros para identificar e quantificar as fábricas de transcrição de diferentes estágios. O resultado obtido, portanto, apresenta números que permitem comparações entre si com confiança.

Tabela 1. Quantificação do número de fábricas de transcrição detectadas de forma automatizada em parasitas a 10 e a 22 hpi. DP, desvio padrão.

Estágio	<i>n</i> núcleos	<i>n</i> fábricas	Número de fábricas (DP)	Volume médio (DP)	Intensidade (DP)
10 hpi	58	502	9 (4)	5.3 (1.7)	1.7 (1.0)
22 hpi	108	621	6 (2)	5.2 (1.6)	3.9 (2.1)

Foi demonstrado por Faro-Trindade e Cook que o número de fábricas de transcrição pode variar quando células-tronco embrionárias totipotentes de camundongos diferenciam-se em células de endoderma parietal. Contudo, essa variação é acompanhada por alterações no volume nuclear, de modo que a densidade de fábricas de transcrição (isto é, o número de fábrica/ μm^3) mantém-se constante ao longo do desenvolvimento. A densidade de fábricas de transcrição também se manteve constante quando outras linhagens celulares tais como HeLa, ou até mesmo células de outros organismos – no caso, de salamandras – foram analisadas, pois ainda que haja um aumento no número absoluto de fábricas de transcrição, este é acompanhado por um aumento no volume nuclear (Faro-Trindade e Cook, 2006a).

Diante desses dados, nos perguntamos se as mudanças no número de fábricas detectado em parasitas a 10 e a 22 hpi poderia ser acompanhado de mudanças no volume nuclear, de forma a manter a densidade de fábricas constante. Contudo, o volume nuclear entre 10 e 22 hpi mantém-se praticamente inalterado (aproximadamente $5 \mu\text{m}^3$), e a diferença de volume entre as duas populações não é estatisticamente significativa ($p = 0.807$).

Portanto, nossos dados sugerem que em *P. falciparum*, ao contrário do que ocorre em eucariotos superiores, a densidade das fábricas de transcrição não se mantém constante ao longo do desenvolvimento do parasita, e mudanças na quantidade de fábricas de transcrição podem ocorrer independentemente de alterações no volume nuclear.

Contudo, a diminuição do número de fábricas a 22 hpi está associado a um aumento na intensidade média das mesmas: a 10 hpi, as fábricas possuem intensidade média de 1.7 (medidas em unidades arbitrárias), enquanto que a 22 hpi, a intensidade média é de 3.9; a diferença entre as médias é estatisticamente significativa ($p < 0.0001$). Novamente, nossos dados diferem do que foi descrito para eucariotos superiores, nos quais a intensidade das fábricas de transcrição se mantém constante durante o processo de diferenciação de células embrionárias totipotentes em endoderma parietal, sugerindo que as fábricas comportam uma quantidade relativamente fixa de RNA nascente (Faro-Trindade & Cook, 2006a). Portanto, nossos dados sugerem que em *P. falciparum*, ao contrário do que ocorre em eucariotos superiores, fábricas de transcrição são estruturas plásticas que podem comportar quantidades variáveis de RNA.

O decréscimo no número de fábricas de 10 para 22 hpi, associado ao concomitante aumento da intensidade das mesmas, sugere que fábricas de transcrição em *P. falciparum* são estruturas dinâmicas, reguladas ao longo do desenvolvimento, e capazes de acomodar síntese de RNA em níveis variados. No momento, contudo, não está claro se o número e a intensidade das fábricas estão relacionados à quantidade de genes transcritos num dado estágio e/ou à quantidade de genes compartilhando uma mesma fábrica, ou ainda à taxa de transcrição basal de cada gene. Dados de *microarray* estimam que haja aproximadamente 560 genes transcritos em parasitas a 10 hpi (idade média da população de 8 a 12 hpi, conforme explicado em Material e Métodos), enquanto que há aproximadamente 360 genes ativos em parasitas a 22 hpi (idade média da população de 20 a 24 hpi; Bozdech *et al.*, 2003, <http://plasmodb.org/plasmo/> - ver tabela 2). Se considerarmos apenas o total de genes transcritos, a hipótese mais simples é a de que a quantidade de fábricas de um dado estágio é ao menos parcialmente determinada pelo número de genes transcritos naquele período. Nesse aspecto, quando

dividimos o número de genes ativos de um estágio pela número médio de fábricas, observamos que tanto a 10 quanto a 22 hpi há cerca de 60 genes, em média, por fábrica. Embora esta seja apenas uma estimativa, o fato de o número médio de genes por fábricas ter se mantido constante entre 10 e 22 hpi sugere que o número de fábricas de transcrição pode estar correlacionado com a quantidade de genes transcritos num dado momento.

Ainda assim, há muito menos fábricas do que genes transcritos num dado estágio, indicando que (i) diferentes genes devem compartilhar fábricas e (ii) o número de fábricas de transcrição é limitante, sendo ao menos uma ordem de grandeza menor do que o número de genes transcritos num dado estágio. Nossos dados estão de acordo com o descrito em células eritróides, cujo número de fábricas de transcrição é limitado a uma média de 200 por núcleo, apesar dessas células expressarem cerca de 4000 genes (Osborne *et al.*, 2004).

Tabela 2. Número teórico médio de genes compartilhando uma mesma fábrica a 10 e a 22 hpi.

Estágio	Número de genes ativos	Número de fábricas	Número teórico médio de genes/fábricas
10 hpi	561	9	~ 62
22 hpi	359	6	~ 60

As fábricas de transcrição de RNAPolII também foram analisadas (figura 8). Em parasitas 22 hpi tratados α -amanitina, observamos em 74% dos casos apenas uma fábrica de transcrição por núcleo, embora duas fábricas tenham sido observadas em 19% dos núcleos analisados. Nos 7% restantes, observamos de três a, raramente, quatro fábricas (dados não mostrados).

Durante o ciclo eritrocítico, *P. falciparum* expressa apenas duas unidades de rRNA *A-type* (McCutchan *et al.*, 1988; Waters *et al.*, 1995). Nós especulamos que cada uma das fábricas resistente à α -amanitina corresponda à transcrição de uma das duas unidades rRNA *A-type*. Contudo, não está claro se, quando apenas uma fábrica é observada, se esta

corresponde à transcrição de apenas uma unidade *A-type*, sendo que a outra unidade estaria silenciada, ou se as duas unidades *A-type* estão sendo transcritas numa mesma fábrica. Em alguns casos foi observada a existência de uma segunda fábrica resistente à α -amanitina, sugerindo que unidades de rRNA *A-type* não compartilham, obrigatoriamente, uma mesma fábrica de transcrição. Em HeLa, diversas unidades de rDNA dividem as mesmas fábricas de transcrição nucleolares (Hozak *et al.*, 1994), contudo a organização genômica dos genes de rDNA nos organismos modelos é tão distinta da observada em *P. falciparum* (Gardner *et al.*, 2002), e a organização do nucléolo neste parasita é tão pouco conhecida, que se torna arriscado estabelecer paralelos entre o nucléolo do parasita e de outros eucariotos, ao menos no que se diz respeito à organização da transcrição.

Também observamos, embora em baixas frequências, que algumas vezes existem por núcleo de 3 a 4 fábricas de transcrição resistentes à α -amanitina. Essas fábricas extras podem ser atribuídas à transcrição de unidades de rRNA *S-type*, cuja expressão ocorre em formas eritrocíticas comprometidas com o desenvolvimento sexual (Waters *et al.*, 1989; Waters *et al.*, 1997). A baixa frequência de núcleos contendo de 3 a 4 fábricas pode ser atribuída, neste caso, à baixa frequência de gametocitogênese na população. Uma outra possibilidade, mais remota, é a de que estas fábricas “extras” estariam localizadas fora do nucléolo e seriam responsáveis pela transcrição de outros genes que não rRNA. Em *Trypanosoma brucei*, os genes *vsg* e *procyclin* são transcritos por RNAPolII em um *expression body* diferente do nucléolo (Landeira & Navarro, 2007; Navarro & Gull, 2001). Contudo, em *P. falciparum*, não existe evidência de que outros genes que não rDNAs sejam transcritos por RNAPolII. Uma terceira possibilidade é que as fábricas “extras” correspondam às fábricas de RNAPolIII, que transcreve tRNA e outros RNAs não codificadores de proteínas (ncRNAs; Pombo *et al.*, 1999). A RNAPolIII de *P. falciparum* não foi funcionalmente caracterizada em relação à sensibilidade à α -amanitina, e não se sabe quais/quantos genes são transcritos por RNAPolIII, mas nós consideramos que, caso as fábricas “extras” resistentes à α -amanitina representassem fábricas de RNAPolIII, então essas fábricas deveriam ser visíveis em frequências maiores que 7%

da população. Portanto, experimentos futuros que combinem tratamento com α -amanitina e RNA-FISH para rRNA *A-type* e *S-type* serão necessários para determinar as frequências de ativação de *S-type* durante o ciclo eritrocítico.

4.3 O número de fábricas de transcrição está fracamente correlacionado com volume nuclear

Conforme mencionado acima, o número de fábricas de transcrição em vertebrados está correlacionado ao volume nuclear (Faro-Trindade & Cook, 2006a). Ainda que a variação inter-populacional (entre 10 e 22 hpi) do número médio de fábricas não seja acompanhada por variações no volume nuclear médio nuclear, nós indagamos se a variabilidade observada no número de fábricas dentro da população de 10 ou 22 hpi está correlacionada ao volume nuclear, que também apresenta variação dentro da população (ver tabela 1). Contudo, o número de fábricas de um dado núcleo apresenta fraca correlação com o volume nuclear (figura 9), como indicado pelos baixos coeficientes de determinação (R^2). Isto reforça a idéia de que em *P. falciparum*, diferentemente do observado em eucariotos superiores, o número de fábricas é dinâmico e está correlacionado primariamente ao número de genes transcritos, e apenas parcialmente ao volume nuclear.

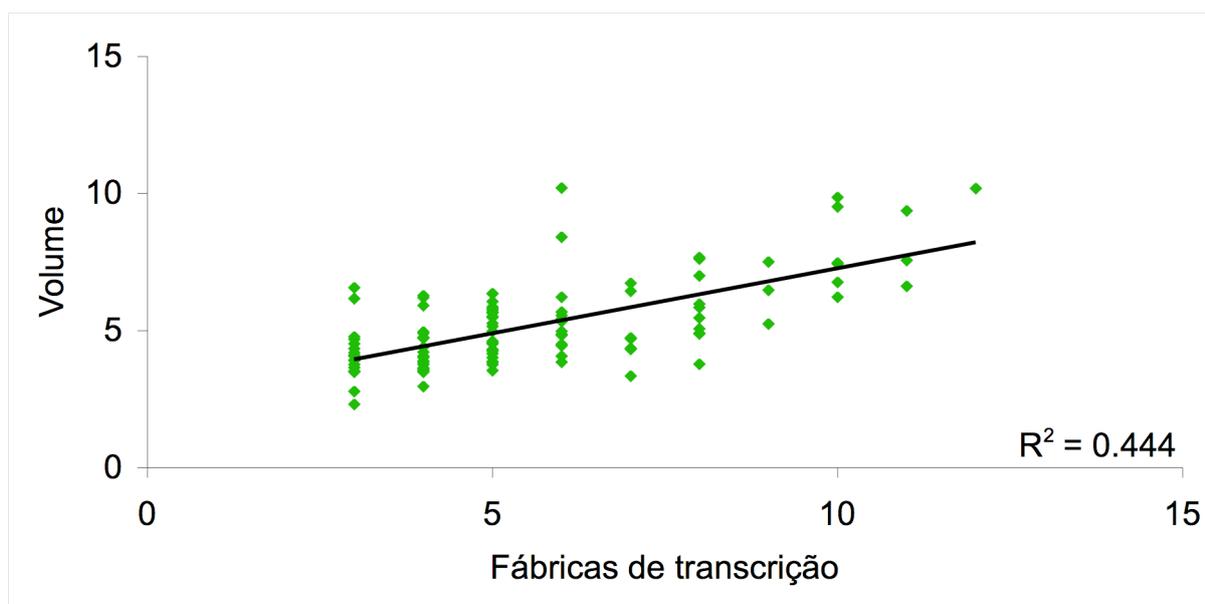
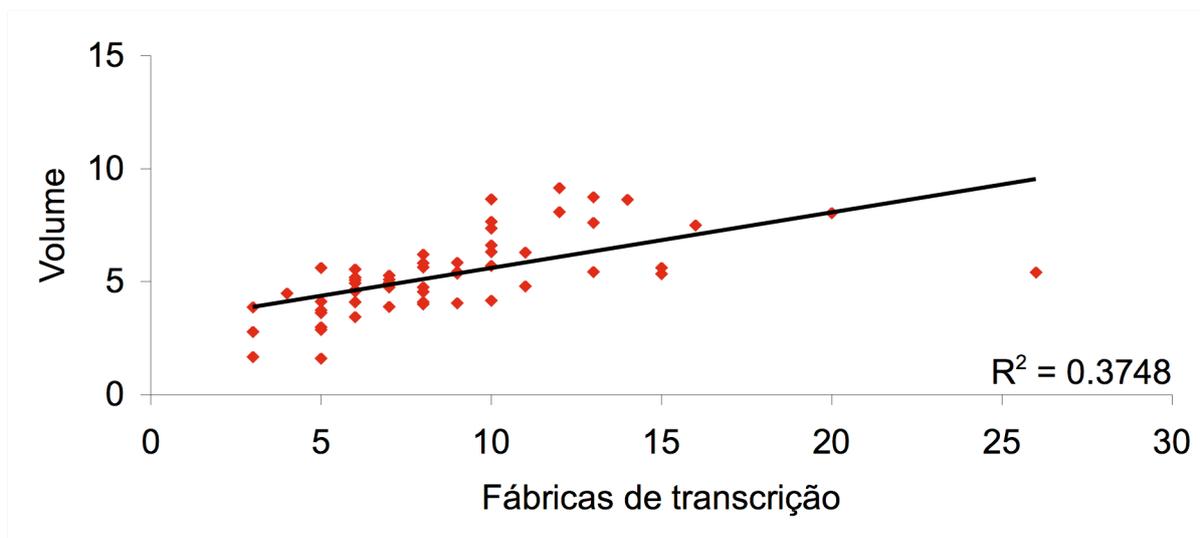


Figura 9. Número de fábricas de transcrição está apenas parcialmente correlacionado com o volume nuclear. Gráficos mostram distribuição do número de fábricas de transcrição de cada núcleo em relação ao volume nuclear. Acima, em vermelho, fábricas de transcrição total em parasitas 10 hpi; abaixo, em verde, fábricas de transcrição total em parasitas 22 hpi. R^2 , coeficiente de determinação.

4.4 Parasitas em diferentes fases do ciclo eritrocítico apresentam distribuição espacial distinta das fábricas de transcrição

Em seguida, nos perguntamos se há mudanças em relação a distribuição nuclear de fábricas de transcrição entre 10 e 22 hpi. Para tanto, a posição nuclear de cada fábrica foi determinada medindo-se a distância da fábrica ao centro do núcleo, e em seguida normalizando as distâncias de forma a permitir comparações entre núcleos diferentes (conforme descrito em Material e Métodos). A análise da distribuição nuclear das fábricas demonstrou que há reorganização espacial da transcrição ao longo do ciclo eritrocítico (figura 10): embora as fábricas estejam distribuídas por todo o núcleo em ambos os casos, a 10 hpi, surpreendentemente, há mais fábricas localizadas preferencialmente na periferia do núcleo, enquanto que a 22 hpi, as fábricas encontram-se quase que igualmente dispersas por três zonas nucleares concêntricas de igual volume. As fábricas de RNAPolII, contudo, estão preferencialmente distribuídas nas zonas mais centrais do núcleo.

Conforme mencionado anteriormente, a zona perinuclear é composta por uma faixa de heterocromatina em *P. falciparum* (Ralph *et al.*, 2005; Ralph & Scherf, 2005), e os fatores de silenciamento PfSir2A, PfOrc1 e PfHP1 encontram-se distribuídos preferencialmente nesta zona nuclear (Freitas-Junior *et al.*, 2005; Mancio-Silva *et al.*, 2008b; Pérez-Toledo *et al.*, 2009). Contudo, a transcrição dos genes *var* ocorre na periferia do núcleo (Ralph *et al.*, 2005; Duraisingh *et al.*, 2005; Marty *et al.*, 2006; Lopez-Rubio *et al.*, 2009), sugerindo que, apesar da presença de estrutura heterocromática e dos fatores de silenciamento, existe uma certa permissividade transcricional nesta região. Semelhante ao que ocorre em *T. brucei* para os genes *vsg* (Navarro & Gull, 2001), e dadas as evidências de que o gene *var* ativo desloca-se dos *clusters* teloméricos quando transcrito (Ralph *et al.*, 2005; Lopez-Rubio *et al.*, 2009), também foi levantada a hipótese de que existe uma região da periferia nuclear especializada na transcrição de genes *var*, e a translocação do gene *var* ativo para esta zona consistiria num mecanismo de exclusão alélica, garantindo que apenas aquele membro da família seja expresso (Scherf *et al.*, 2008).

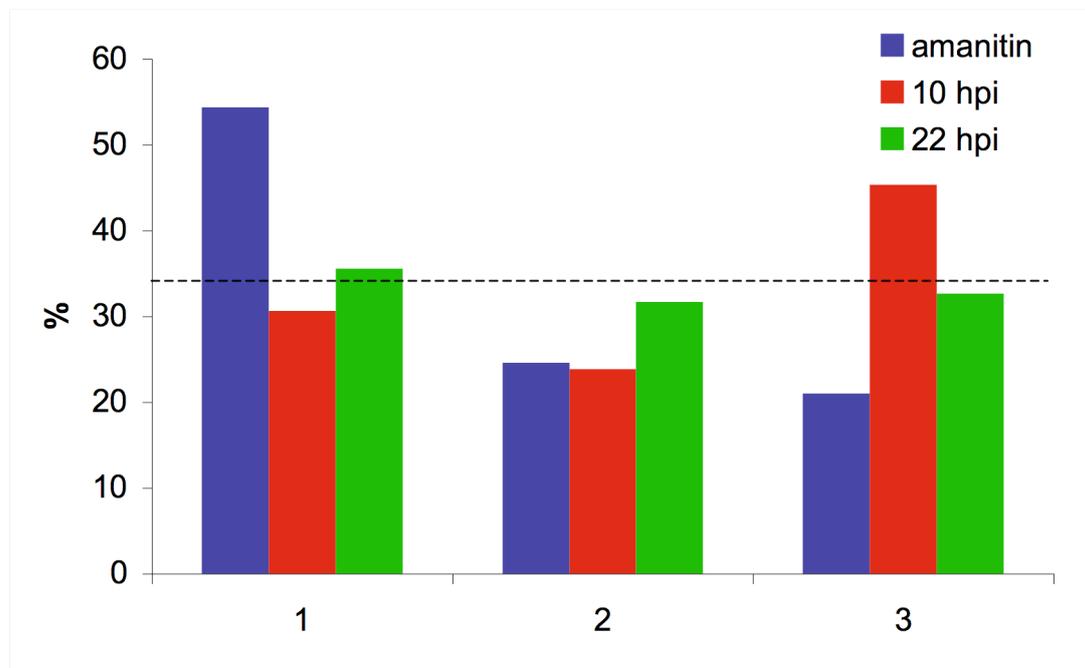


Figura 10. Redistribuição das fábricas de transcrição durante o ciclo eritrocítico. Histograma mostrando a distribuição relativa de fábricas de transcrição em 3 zonas nucleares concêntricas de volume iguais, sendo a zona 1 mais central e a zona 3 mais periférica (ver Material e Métodos). A linha pontilhada indica o valor de 33,3%, correspondente à probabilidade de localização ao acaso de fábricas de transcrição em umas das 3 zonas. *Amanitin* indica parasitas em que a incorporação de BrUTP se deu na presença de 200 $\mu\text{g/ml}$ de α -amanitina, conforme descrito em Material e Métodos.

Nossos resultados são os primeiros, entretanto, a sugerir que a periferia seja a região preferencial de transcrição geral em parasitas a 10 hpi, e não apenas de genes *var*. A periferia não é, contudo, a região preferencial de transcrição em todo o ciclo de vida, já que a 22 hpi as regiões central, intermediária e periférica apresentam a mesma probabilidade de conter fábricas de transcrição. Recentemente, foi descrito que a probabilidade da transcrição do gene *var* ativo ocorrer na periferia do núcleo é cerca de 45 - 50% (Lopez-Rubio *et al.*, 2009), muito semelhante às frequências de fábricas de transcrição na periferia a 10 hpi. Em vista desses achados, as frequências de localização do gene *var* na periferia do núcleo devem ser interpretadas com cautela pois podem, simplesmente, refletir a maior probabilidade de um dado gene ser transcrito na periferia em parasitas na fase anel.

Este também é o primeiro relato quantitativo que encontramos de uma localização preferencial de fábricas de transcrição numa zona nuclear, já que em mamíferos as fábricas de transcrição encontram-se distribuídas por todo o núcleo (Faro-Trindade & Cook, 2006a). Neste mesmo estudo, os autores ainda reportaram que não há qualquer mudança no padrão aleatório de distribuição nuclear das fábricas durante a diferenciação de células-tronco de camundongos em endoderma parietal. Portanto, o fato de as fábricas de transcrição em *P. falciparum* sofrerem redistribuição espacial entre 10 e 22 hpi é bastante surpreendente, e reforça a noção de que as fábricas de transcrição são estruturas plásticas, reguladas de forma diferenciada ao longo do processo de desenvolvimento/diferenciação que ocorre durante o ciclo eritrocítico.

As fábricas de transcrição de RNAPoll foram encontradas em maior frequência na zona central do núcleo (figura 10). Este achado é bastante inesperado dado que o nucléolo foi descrito como uma estrutura perinuclear em *P. falciparum*. Contudo, neste estudo (Figueiredo *et al.*, 2005) foram utilizados parasitas na fase anel, enquanto nós medimos a distribuição de fábricas de RNAPoll em parasitas da fase trofozoíta (22 hpi). Em vista da redistribuição espacial de fábricas de transcrição total observada entre 10 e 22 hpi, não é de todo inesperado que a transcrição nucleolar – ou talvez o nucléolo como um todo – possa também sofrer translocação espacial durante o ciclo eritrocítico.

Recentemente, foi descrito que PfSir2A e PfOrc1 colocalizam com nucléolo na periferia nuclear em anéis, mas sofrem dispersão pelo núcleo em trofozoítas e esquizontes (Mancio-Silva *et al.*, 2008b). Esses resultados sugerem que é possível que material nucleolar seja redistribuído pelo núcleo, possivelmente como consequência da entrada na fase S, conforme o parasita avança pelo ciclo eritrocítico. Portanto, o fato de transcrição por RNAPolII localizar-se preferencialmente no centro do núcleo pode refletir a dispersão de componentes nucleolares ao início da fase S.

4.5 A transcrição ocorre preferencialmente em áreas de baixa densidade de cromatina

Dada a distribuição das fábricas de transcrição por todo o núcleo, ainda que preferencialmente localizada na periferia em parasitas 10 hpi, nos perguntamos se a posição nuclear das fábricas de transcrição está correlacionada com a intensidade das mesmas, isto é, se fábricas de intensidade diferentes encontram-se distribuídas em zonas nucleares distintas. Alguma evidência a favor da distribuição preferencial foi observada durante as análises das séries-Z confocais, que demonstraram que, ao menos em alguns núcleos, as fábricas de transcrição mais intensas localizavam-se sobretudo na zona periférica. Frequentemente também observamos que as fábricas de transcrição mais intensas localizavam-se em áreas nucleares de baixa marcação por DAPI.

Quando a intensidade de cada uma das fábricas de transcrição foi analisada em relação a sua posição nuclear, verificamos que não existe correlação, ao menos linear, entre a intensidade de uma fábrica e a sua distância radial ao centro do núcleo, tanto em parasitas a 10 quanto a 22 hpi (figura 11).

Contudo, a análise da relação entre o sinal de BrRNA com o de DAPI mostra que estes dois marcadores estão inversamente relacionados, sendo que os picos do sinal de BrRNA, que correspondem a fábricas de transcrição, localizam-se em áreas de baixa marcação por DAPI (figura 12). Esses resultados sugerem que a transcrição ocorre preferencialmente em um compartimento nuclear caracterizado por baixa marcação por DAPI, e indicam que a intensidade de uma fábrica de transcrição não está correlacionada com a sua posição nuclear, mas sim com a menor densidade de cromatina associada àquela região.

Em mamíferos sabe-se que a transcrição ocorre em áreas de baixa densidade de cromatina localizadas na superfície dos territórios de cromossomos, e a região central das fábricas é ocupada apenas por proteínas e BrRNA, mas não DNA (Cmarko *et al.*, 1999; Eskiw *et al.*, 2008; Zirbel *et al.*, 1993). Nesse contexto, nossos dados indicam que as regiões de

baixa intensidade de DAPI em *P. falciparum* correspondem a regiões de baixa densidade de cromatina e que, assim como em mamíferos, a transcrição ocorre preferencialmente na superfície dos cromossomos, onde genes ativos estariam localizados.

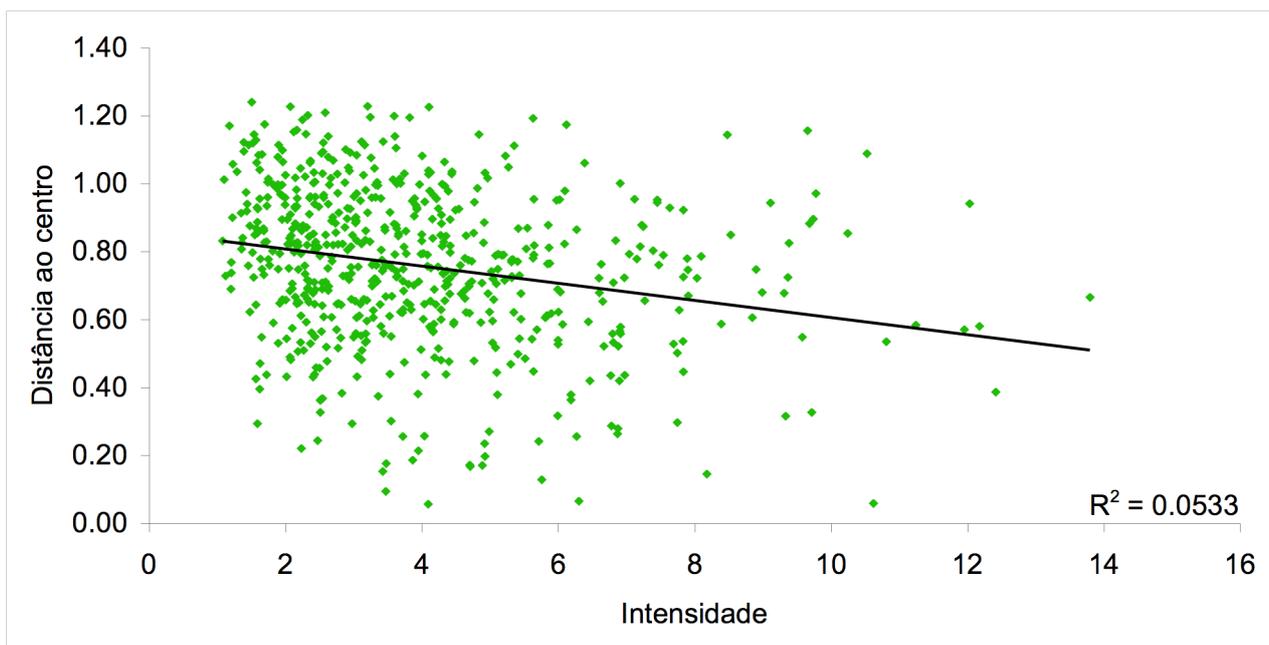
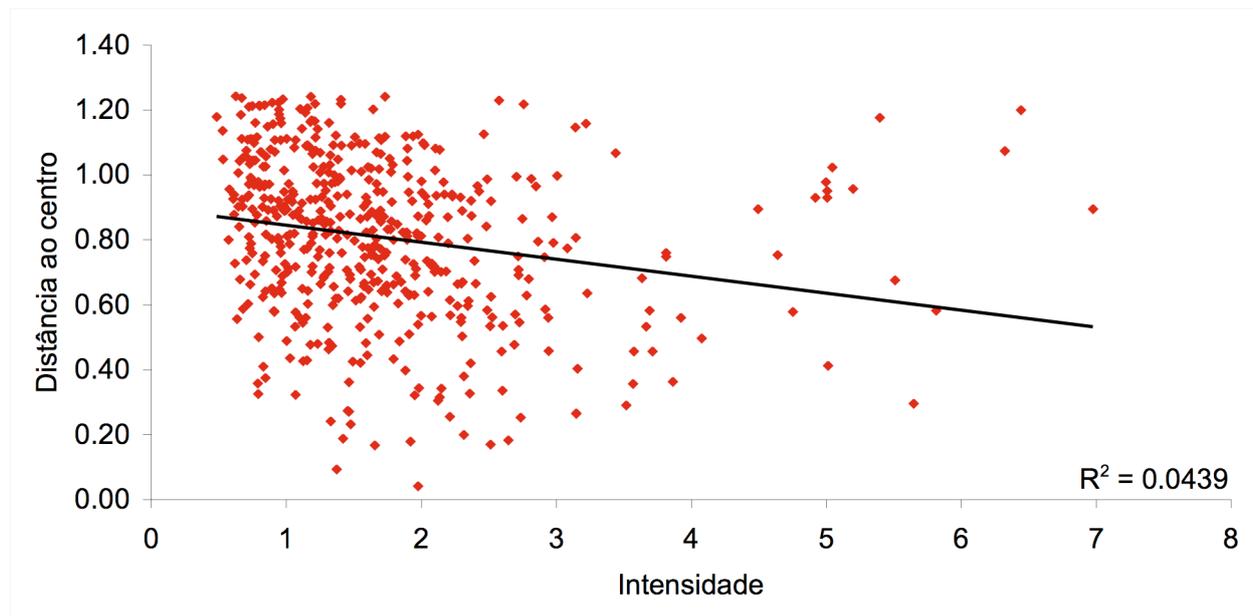
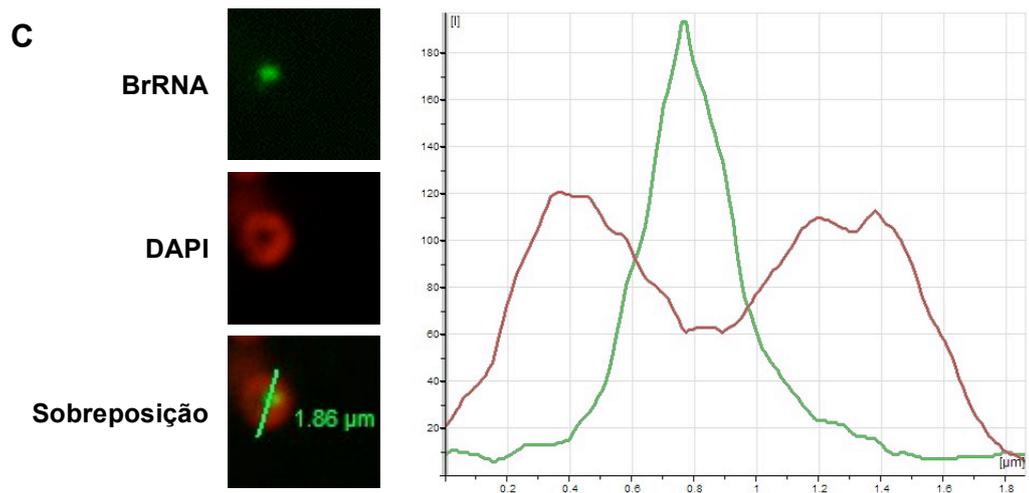
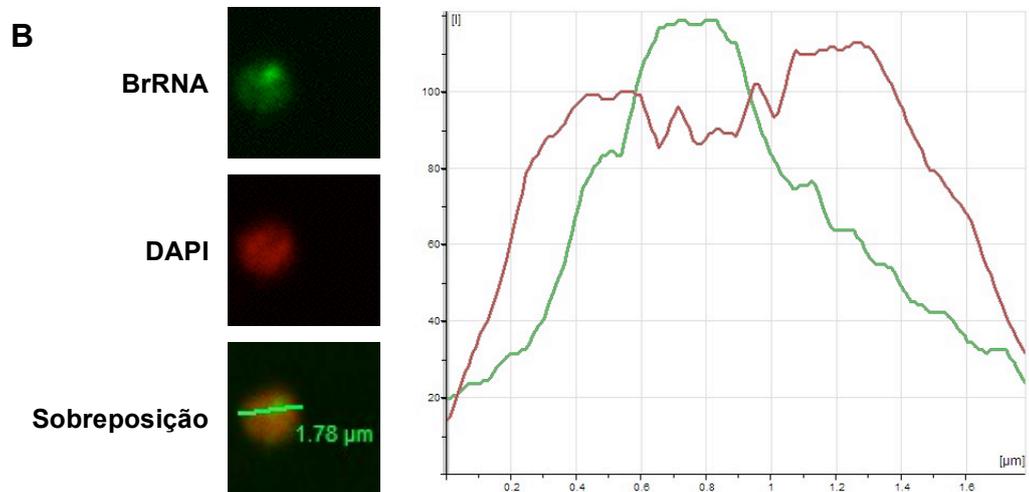
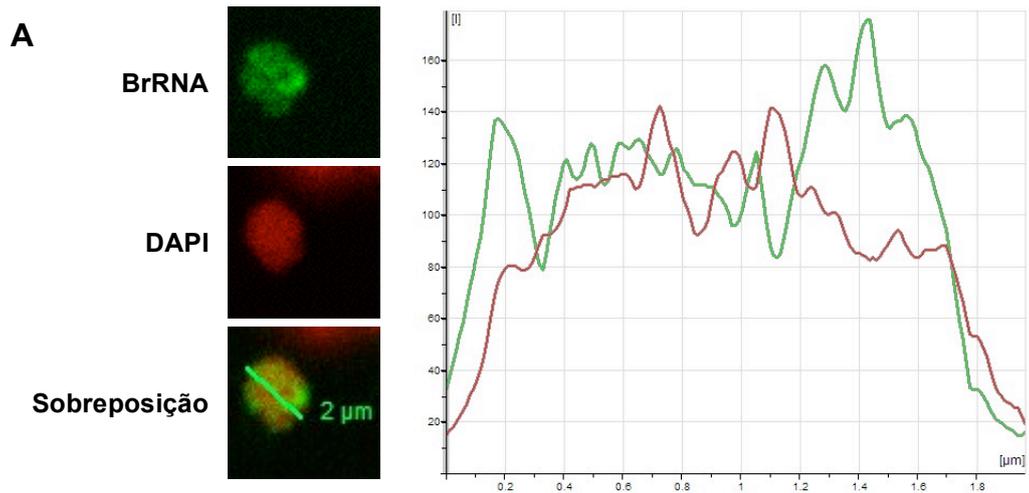


Figura 11. Intensidade das fábricas de transcrição não está relacionada com a posição da fábrica no núcleo. Gráficos mostram distribuição da intensidade de cada fábrica de transcrição em relação à distância da fábrica ao centro do respectivo núcleo. Acima, em vermelho, fábricas de transcrição total em parasitas 10 hpi; abaixo, em verde, fábricas de transcrição total em parasitas 22 hpi. R^2 , coeficiente de determinação.

Figura 12. Fábricas de transcrição localizam-se preferencialmente em zonas de baixa densidade de cromatina. Os gráficos mostram o perfil de intensidade das fábricas de transcrição (BrRNA, em verde) e cromatina (DAPI, em vermelho) ao longo da linha (em verde) traçada sobre a imagem confocal correspondente, conforme mostrado (sobreposição). (A) transcrição total em parasitas 10 hpi; (B) transcrição total em parasitas 22 hpi; (C) transcrição na presença de 200 $\mu\text{g/ml}$ α -amanitina (parasitas 22 hpi).



4.6 Fábricas de transcrição definem um compartimento nuclear distinto de zonas de silenciamento em *P. falciparum*

O núcleo do *P. falciparum* é organizado em subcompartimentos discretos, e zonas de cromatina ativa localizam-se em compartimentos distintos de zonas de silenciamento (Issar *et al.*, 2009, Volz *et al.*, 2009). Diante desse cenário, nos perguntamos se as fábricas de transcrição formam um compartimento exclusivo, ou se são definidas não só pelos sítios de BrRNA mas também por outros marcadores de cromatina ativa.

O primeiro marcador a ser estudado foi PfSir2A, uma deacetilase de histonas que se encontra distribuída na periferia nuclear e no nucléolo e capaz de silenciar genes de virulência tais como genes *var* e *rif* (Freitas-Junior *et al.*, 2005; Duraisingh *et al.*, 2005; Tonkin *et al.*, 2009). Dado que fábricas de transcrição foram observadas na periferia nuclear tanto a 10 quanto a 22 hpi (figura 8 e 10), nos perguntamos se as fábricas periféricas localizariam em áreas marcadas por PfSir2A.

Ensaio de imunofluorescência para PfSir2A e combinado com incorporação de BrUTP mostram que fábricas de transcrição formam compartimentos excludentes, ainda que ambos ocupem a periferia nuclear (figura 13A). O mesmo ocorre para fábricas de RNAPoll embora PfSir2A localize-se também no nucléolo, a transcrição por RNAPoll ocorre em áreas pobres em/excluídas de PfSir2A (figura 13A). Estes resultados mostram que a periferia nuclear é uma região que comporta transcrição e silenciamento lado a lado, sugerindo a existência de um alto grau de subcompartimentalização e especialização regional de processos distintos de regulação transcricional. Contudo, os fatores moleculares que garantem a “insulação” de processos antagônicos tais como silenciamento e transcrição permanecem completamente desconhecidos.

4.7 O marcador nucleolar PfNop1 colocaliza apenas parcialmente com fábricas de RNApoll

A relação das fábricas de transcrição com o marcador nucleolar PfNop1 também foi analisada (figura 13B). Em condições de marcação total, não se observa qualquer colocalização entre PfNop1 e fábricas de transcrição, sugerindo que nestas condições a marcação por RNApoll é favorecida. Contudo, na presença de α -amanitina, apenas a transcrição por RNApoll é detectada e se observa colocalização parcial de fábricas de RNApoll com PfNop1 (figura 13B). Em alguns casos, observamos colocalização de apenas uma das duas fábricas de RNApoll detectadas com PfNop1. O fato das fábricas de RNApoll não necessariamente colocalizarem com o marcador nucleolar PfNop1 em *P. falciparum* sugere que a organização da transcrição nucleolar deste parasita difere da de outros eucariotos.

Em eucariotos em geral, a transcrição de rRNA ocorre nas regiões fibrilares, da qual a proteína fibrilarina, ou PfNop1, é um componente estrutural (Raksa *et al.*, 2006). As regiões fibrilares nunca foram visualizadas no nucléolo de *P. falciparum*, e portanto não se sabe se o papel de PfNop1 seria o mesmo exercido pela fibrilarina/Nop1 em outros eucariotos. Além disso, a colocalização ocasional de PfNop1 e fábricas de RNApoll pode ser um reflexo da possível dispersão dos componentes nucleolares com a entrada do parasita na fase S, conforme discutido acima (ver item 4.4).

Contudo, dado o pequeno número de unidades de rDNA, e a regulação especial a que estão submetidas, o nucléolo em *Plasmodium* aparenta ser altamente diferenciado do nucléolo de outros eucariotos. Até o momento, poucos estudos caracterizaram o nucléolo de *P. falciparum*, e o marcador nucleolar de excelência é PfNop1 (Figueiredo *et al.*, 2005), mas também PfSir2A, PfOrc1 e telomerase são encontrados no nucléolo (Freitas-Junior *et al.*, 2005; Figueiredo *et al.*, 2005; Mancio-Silva *et al.*, 2008a), indicando que este compartimento está associado com outras funções além da síntese de rRNA. Além disso, pouco se conhece sobre a regulação das diferentes unidades de rDNA, e mais estudos, tais como DNA/RNA-FISH

para as diferentes unidades de rDNA/rRNA, seriam necessários para explicar a colocação parcial da fábricas de RNAPolII com PfNop1 e também para investigar a dinâmica da organização nucleolar ao longo do ciclo eritrocítico.

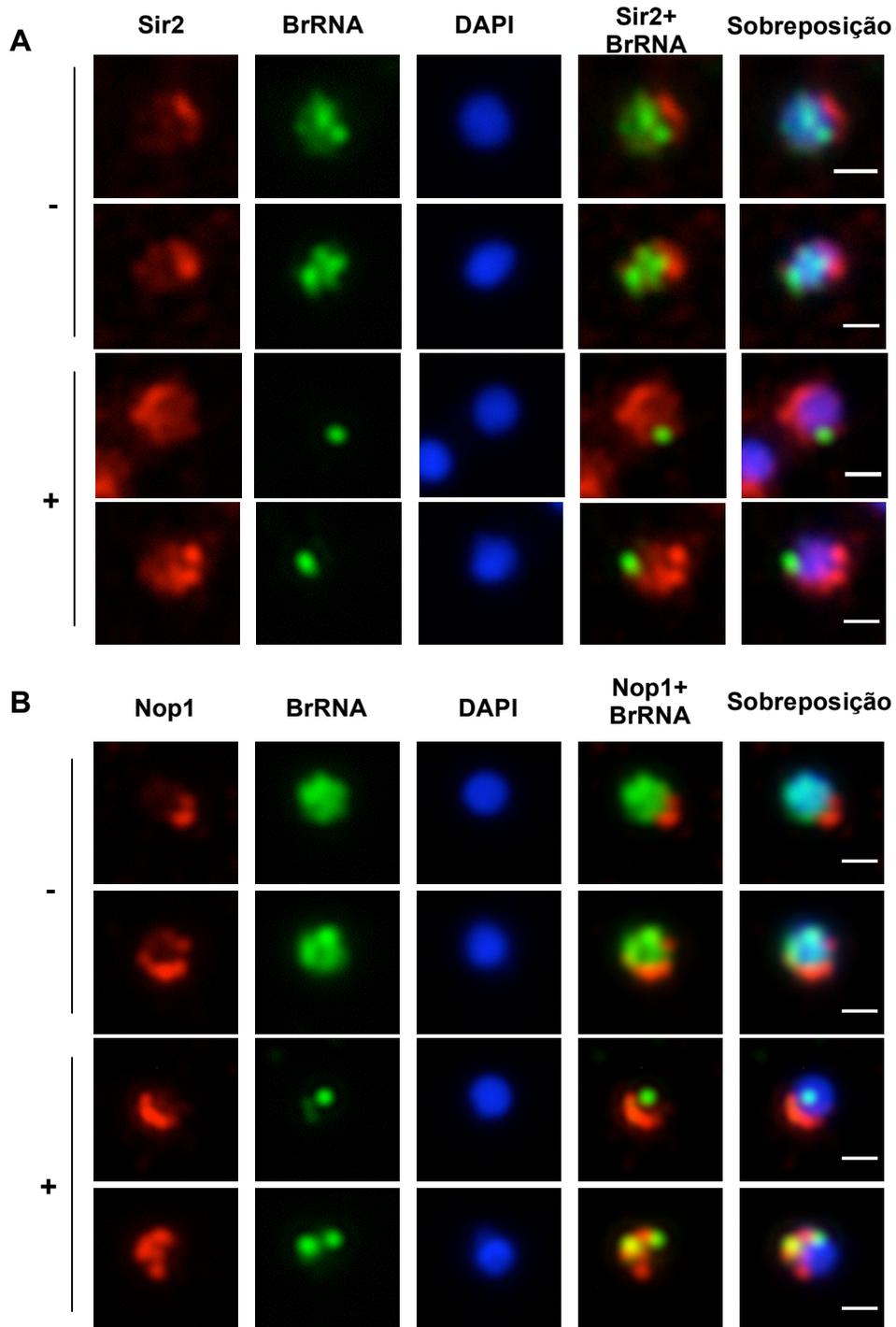


Figura 13. Fábricas de transcrição localizam em um compartimento nuclear diferenciado de áreas de silenciamento e do nucléolo. Ensaio de imunofluorescência para RNAs nascentes de parasitas jovens (fase anel) marcados com BrUTP (BrRNA, em verde) e para os compartimentos de (A) PfSir2A e (B) PfNop1 (ambos em vermelho). À esquerda, os sinais “-” (transcrição total) e “+” (transcrição por Pol I, apenas) indicam respectivamente a ausência ou presença de 200 $\mu\text{g/ml}$ de α -amanitina durante o ensaio de incorporação de BrTUP. DNA corado com DAPI, em azul. Barras, 1 μm .

4.8 Modificações de histonas características da cromatina ativa não determinam o compartimento de transcrição

A acetilação de histonas é uma das características de cromatina ativa tanto em eucariotos superiores quanto em *P. falciparum*. A cromatina ativa pode ser visualizada por marcação com anticorpo específico para acetilação da histona H4 (H4ac), por exemplo (Freitas-Junior *et al.*, 2005). Utilizando ensaio de imunofluorescência, decidimos investigar a organização espacial da cromatina ativa em relação às fábricas de transcrição, a fim de verificar se H4ac é um marcador de fábricas de transcrição. Contudo, embora as fábricas de transcrição estejam aparentemente contidas no espaço ocupado pela cromatina ativa, o padrão observado em imunofluorescência para H4ac mostra-se diferenciado do padrão de BrRNA (figura 14A), tanto para transcrição total quanto para transcrição por RNAPoll. Aparentemente, H4ac está distribuída por todo o núcleo e parece marcar toda a cromatina visualizada por DAPI, sugerindo que o estado de acetilação da cromatina não é suficiente para determinar a transcrição de um gene em *P. falciparum*.

Essas observações vão ao encontro do que foi descrito por (Salcedo-Amaya *et al.*, 2009). Neste trabalho, os autores demonstraram que os promotores de genes transcritos em esquizontes possuem um alto grau de histona H3 acetilada na lisina 9 (H3K9ac), um marcador clássico de cromatina ativa em eucariotos superiores e leveduras e que, após a invasão, quedas nos níveis de expressão dos genes são acompanhadas por quedas nos níveis de H3K9ac e aumento nos níveis de histona H3 trimetilada na lisina 9 (H3K9me3), um marcador de heterocromatina. Contudo, genes transcritos em anéis não apresentam diferenças nos níveis de H3K9ac/H3K9me3 quando ativos em comparação aos níveis detectados quando estão silenciados. Portanto, este estudo mostra que o estado de acetilação de um gene não é fator suficiente para garantir a transcrição, e que genes expressos em diferentes fases do ciclo eritrocítico apresentam regulação diferenciada, ao menos no que diz respeito ao padrão de acetilação/trimetilação de H3K9. Um outro estudo demonstrou que os fatores de transcrição PFTBP e PFTFIIE, que fazem parte do complexo de pré-

iniciação (PIC) da RNAPolIII, permanecem ligados aos genes ativos durante o ciclo eritrocítico, independentemente do estado transcricional e dos níveis de H3ac e H4ac dos genes (Gopalakrishnan *et al.*, 2009). Neste contexto, nossos resultados mostram que a acetilação de histonas não está correlacionada com a presença de um gene em fábricas de transcrição e que, até então, BrRNA é o único marcador dessas estruturas em *P. falciparum*.

Recentemente foi sugerido por Scherf e colaboradores que a histona H3 trimetilada na lisina 79 (H3K79me3) seria um marcador para fábricas de transcrição em *P. falciparum* (Issar *et al.*, 2009). Contudo, a análise de marcação de BrRNA concomitantemente à marcação de H3K79me3 mostrou que fábricas de transcrição – tanto fábricas de RNAPolII quanto de RNAPolIII – formam um compartimento distinto de H3K79me3 (figura 14B). Curiosamente, ambos marcadores resultam em um padrão de estruturas pontuadas discretas distribuídas por todo o núcleo, contudo cada marcador caracteriza um compartimento diferenciado, aparentando inclusive serem excludentes. Portanto, H3K79me3 não parece ser um marcador de fábricas de transcrição e mais estudos são necessários para elucidar a função desta modificação de histona na regulação gênica em *P. falciparum*.

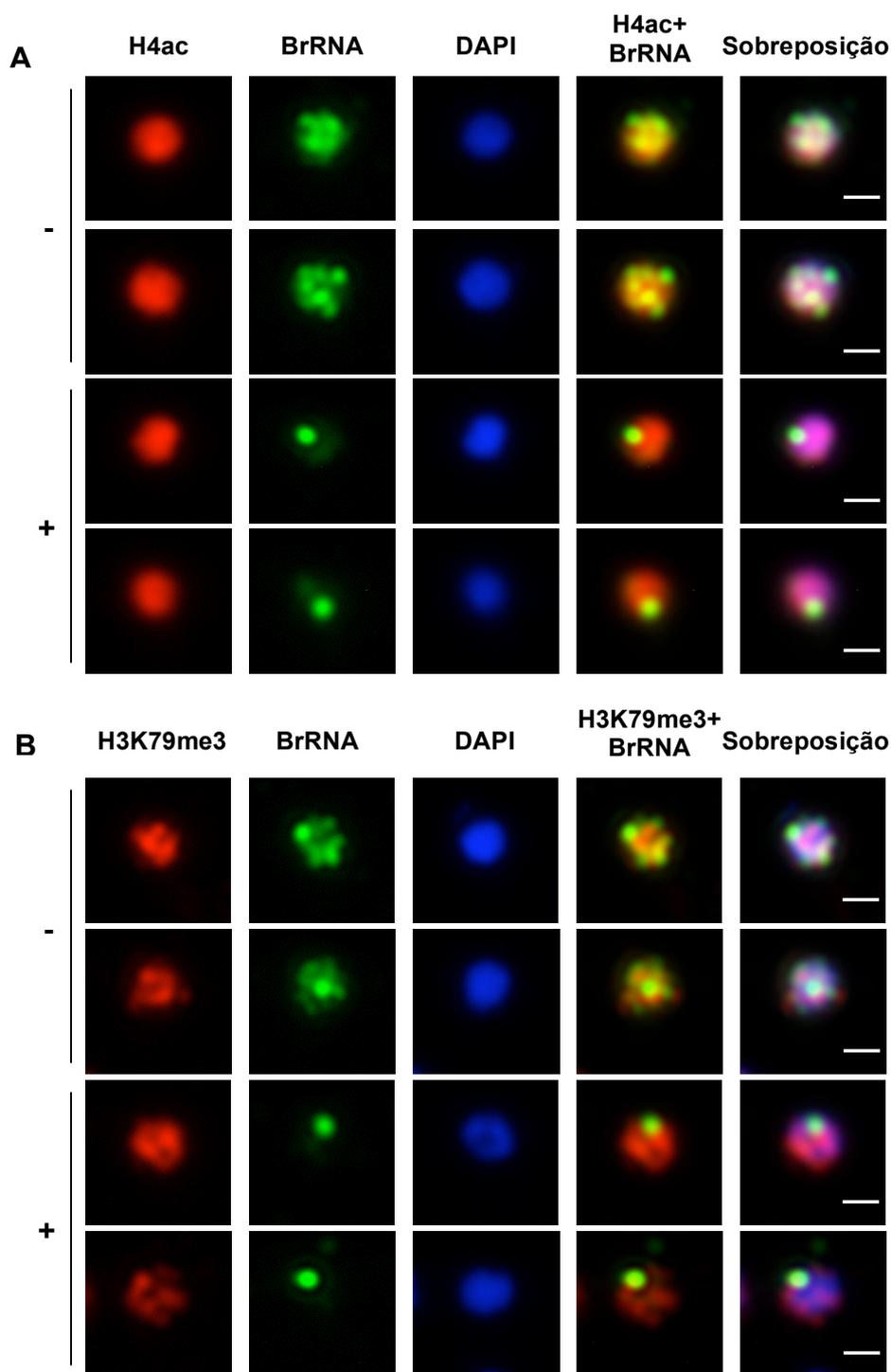


Figura 14. Fábricas de transcrição localizam em um compartimento nuclear diferenciado da cromatina ativa e da modificação H3K79me3. Ensaio de imunofluorescência para RNAs nascente de parasitas na fase anel (BrRNA, em verde) e para os compartimentos (em vermelho) de (A) cromatina ativa, definida por H4ac, e (B) H3K79me3, proposto marcador de fábricas de transcrição. Os sinais “-” (transcrição total) e “+” indicam respectivamente ausência ou presença de 200 $\mu\text{g/ml}$ de α -amanitina durante o ensaio de incorporação de BrTUP. DNA corado com DAPI, em azul. Barras, 1 μm .

4.9 Considerações sobre a arquitetura da transcrição e organização espacial da cromatina

Em resumo, nossos resultados sugerem fortemente que a transcrição em *P. falciparum* está de fato organizada em fábricas, estruturas dinâmicas que variam em número, localização e intensidade durante o ciclo eritrocítico. Ao contrário do que foi demonstrado em outros eucariotos, a quantidade de fábricas de transcrição em *P. falciparum* não parece estar correlacionada com o volume nuclear, mas há indícios de que o número de fábricas esteja associado à quantidade de genes expressos durante um determinado período do ciclo eritrocítico. Dado que há muitos mais genes ativos do que fábricas de transcrição observadas durante um dado momento do ciclo, os genes ativos seriam obrigados a compartilhar fábricas ao serem transcritos.

As diferenças na quantidade, distribuição e intensidade das fábricas de transcrição em parasitas das fases anel e trofozoíta indicam que as fábricas de transcrição são um compartimento nuclear regulado durante as etapas de desenvolvimento do parasita de anel para esquizonte, apontando para a necessidade de se especificar e considerar a fase do ciclo eritrocítico quando se estuda a organização nuclear. As fábricas de transcrição formam um compartimento nuclear novo, distinto de todos descritos até então para *P. falciparum*, e estão localizadas preferencialmente em áreas de baixa densidade de cromatina, sugerindo que a organização da transcrição está ligada à organização espacial dos cromossomos.

Dado que os genes de *P. falciparum* são regulados ao longo do desenvolvimento no ciclo eritrocítico (Bozedch *et al.*, 2003; Le Roch *et al.*, 2003), nos perguntamos se genes co-regulados estariam associados espacialmente no momento da transcrição, ou seja, se genes funcionalmente relacionados e co-expressos seriam transcritos na mesma fábrica (figura 15). Esta hipótese encontra um paralelo em mamíferos, dado que diversos genes regulados ao longo do desenvolvimento/diferenciação apresentam-se em maior proximidade no núcleo quando transcritos, sugerindo que tais genes estejam compartilhando a mesma fábricas de transcrição (Sutherland & Bickmore, 2009).

Com exceção dos genes *var* e clusters teloméricos, pouco se sabe sobre a organização espacial do genoma de *P. falciparum*. Não se sabe, por exemplo, se os cromossomos ocupam territórios preferenciais, tal como em mamíferos (Cremer *et al.*, 2006), ou se estão distribuídos aleatoriamente pelo núcleo (ainda que ancorados à membrana nuclear – ver hipóteses A e B na figura 15). Portanto, esses e outros cenários plausíveis devem ser elucidados para obtermos uma idéia clara da organização espacial da cromatina neste parasita, e determinar assim com maior clareza como a arquitetura do núcleo e regulação gênica estão relacionados.

A fim de testar a hipótese de que genes funcionalmente relacionados e co-expressos dividem a mesma fábrica de transcrição, resolvemos investigar ao longo do ciclo eritrocítico a posição de genes co-ativados, tais como genes de invasão, utilizando *Fluorescence in situ hybridization* para visualização de seqüências específicas de DNA (DNA-FISH).

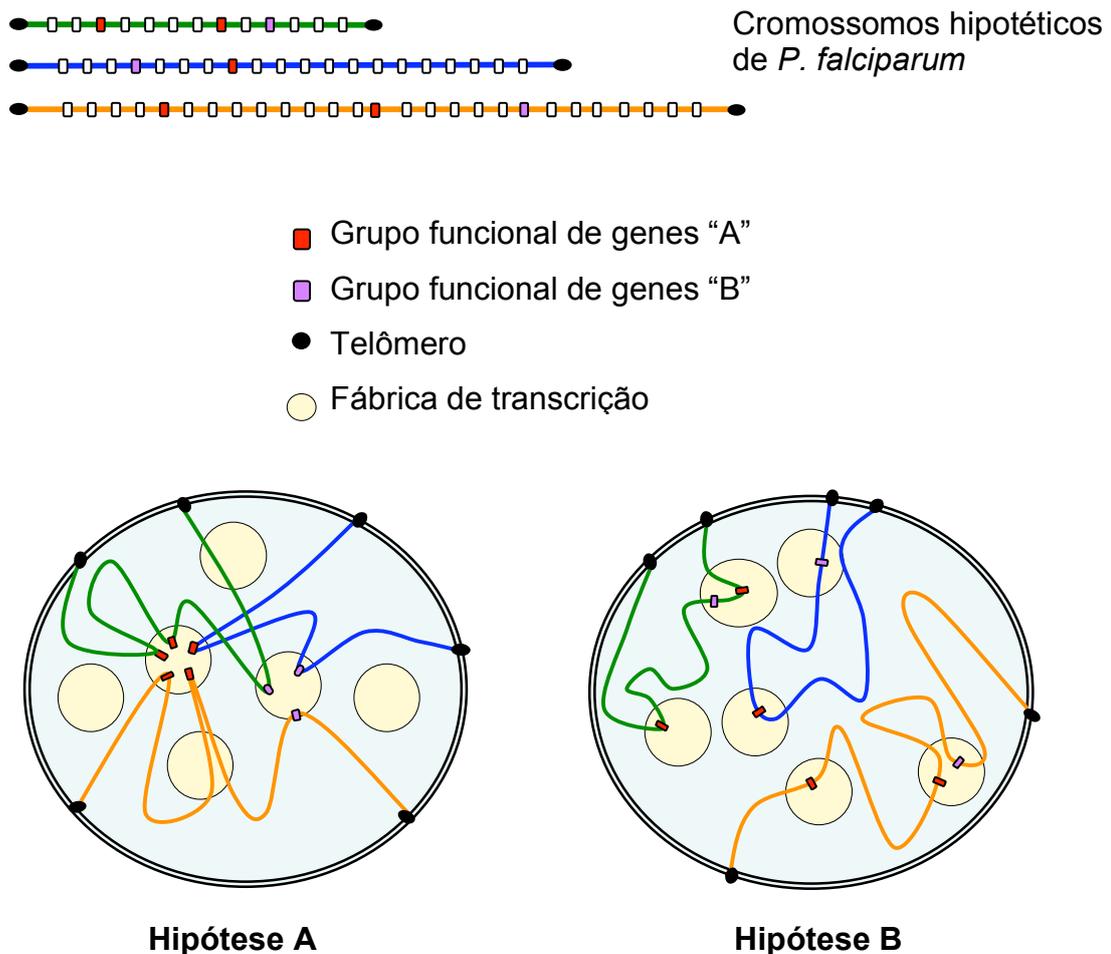


Figura 15. Hipóteses sobre a organização da cromatina e da transcrição em *P. falciparum*. Acima, três cromossomos hipotéticos são representados contendo telômeros (círculos pretos) e genes (retângulos) também hipotéticos. Retângulos brancos representam genes silenciados durante o ciclo eritrocítico, retângulos vermelhos e roxos representam grupos distintos (“A” e “B”) de genes co-expressos que são funcionalmente correlacionados (ou seja, estão ligados a uma mesma via, tal como invasão ou replicação de DNA). Contudo, grupos “A” e “B” não são funcionalmente relacionados entre si. A hipótese A mostra que genes de um mesmo grupo compartilham uma mesma fábrica de transcrição entre si, mas não com genes de grupos diferentes. Na hipótese B, a transcrição dos genes é confinada ao território ocupado pelo cromossomo, ou então ocorre aleatoriamente em qualquer fábrica de transcrição disponível, havendo promiscuidade no grupo de genes que compartilham uma mesma fábrica.

4.10 Um novo protocolo para FISH resulta em núcleos mais conservados

O protocolo de DNA-FISH foi originalmente desenvolvido em *P. falciparum* para visualização dos *clusters* teloméricos (Freitas-Junior *et al.*, 2000). Contudo, ao executarmos este protocolo para visualização de genes de cópia única (tais como os genes de invasão), observamos um baixíssimo rendimento nos experimentos, sendo raros os núcleos que apresentavam sinais. Além disso, o *background* exibido nas preparações era bastante intenso e se assemelhava a sinais autênticos de FISH, dificultando bastante a interpretação dos resultados. Por fim, também observamos alterações inconsistentes na morfologia nuclear, tais como núcleos de contorno irregular e ramificado. Estas alterações, contudo, nunca eram observadas em outras preparações tais como imunofluorescência de células mantidas em suspensão ou de células marcadas com BrUTP. Também frequentemente observamos que sinais autênticos de FISH localizavam-se relativamente distantes do núcleo definido pela marcação com DAPI.

Estes fatos nos motivaram a estabelecer um protocolo alternativo que permitisse melhor conservação da estrutura nuclear, diminuindo o *background* observado em preparações de FISH e, assim, permitir obtenção resultados reprodutíveis e confiáveis.

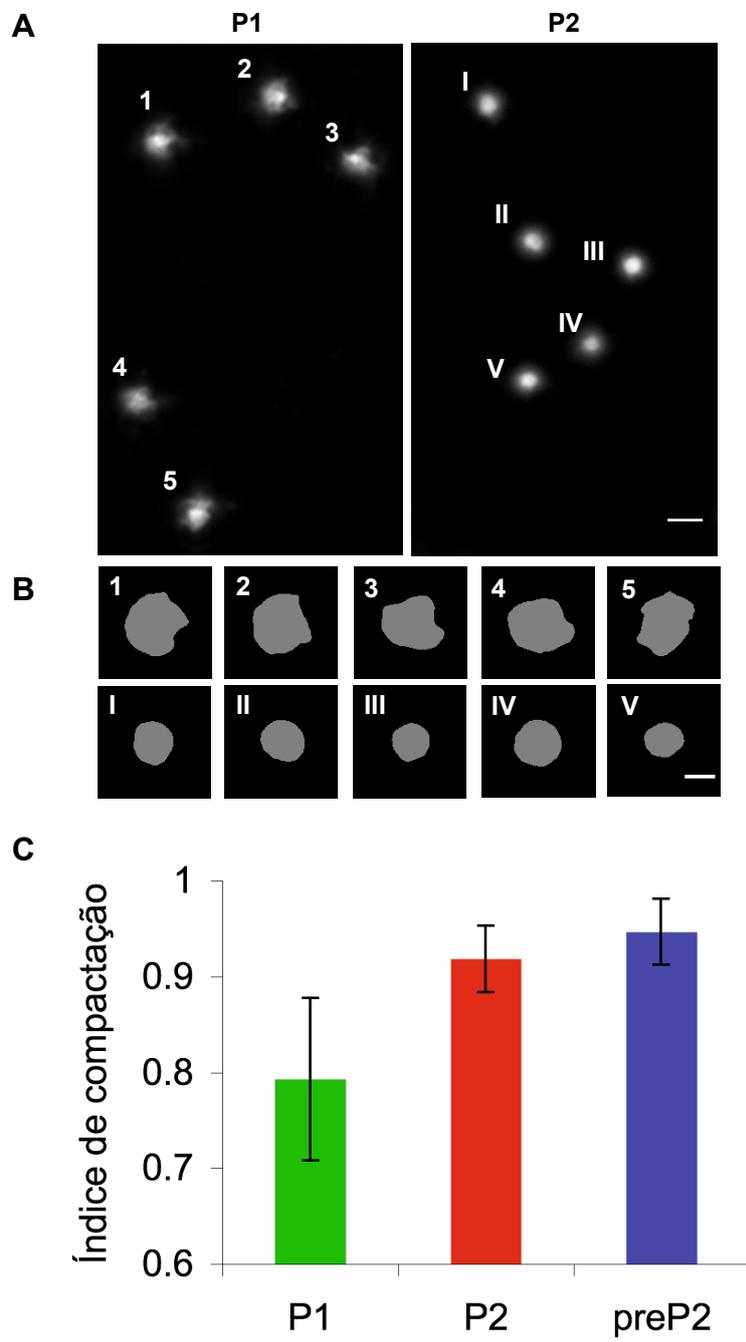
Enquanto tentávamos estabelecer este protocolo, optamos por utilizar sondas para telômeros e para a repetição Rep20. Telômeros e Rep20 localizam-se nos *clusters* teloméricos e, devido aos tamanhos e presença em todos os cromossomos (ou quase todos, no caso de Rep20), as repetições de telômero e Rep20 produzem sondas de DNA-FISH robustas e de fácil detecção, tornando-as candidatas ideais para otimização do protocolo de DNA-FISH.

O procedimento típico de FISH requer uma série de diferentes etapas tais como desidratação, fixação, desnaturação e hibridização. Algumas destas etapas podem afetar a ultraestrutura nuclear (Kozubek *et al.*, 2000; Mongelard *et al.*, 1999; Solovei *et al.*, 2002). Quando os eritrócitos infectados são secos anteriormente à fixação (P1 – ver Material e Métodos),

consistentemente observamos alterações da morfologia nuclear, intenso *background* e localização dos sinais de FISH muitas vezes fora do núcleo, conforme mencionado acima. Isso nos levou a especular se o tratamento aos quais as células eram submetidas antes do FISH, isto é, secagem e fixação por curto período à temperatura ambiente, estariam ainda que indiretamente relacionadas à perda da estrutura nuclear durante a execução do FISH. Portanto, decidimos estabelecer um protocolo de fixação alternativo. Ao menos qualitativamente, fixações mais longas (~16 h) de células mantidas em suspensão a temperaturas mais baixas resultam em núcleos mais esféricos e definidos espacialmente, de morfologia mais conservada, assemelhando-se à morfologia nuclear normalmente observada quando outras técnicas tais como imunofluorescência em suspensão são executadas (figura 16A).

A fim de quantificar as diferenças observadas na morfologia entre núcleos submetidos a P1- e P2-FISH, utilizamos um algoritmo bem estabelecido de análise automatizada de imagem para computar a forma e a deformação dos núcleos (figura 16B). Este algoritmo é normalmente chamado de índice de compactação e mede o grau de “circularidade”, ou compactação, de um objeto em 2D (no caso, núcleos corados com DAPI). Como esperado, núcleos submetidos a P1-FISH mostraram-se mais deformados, com um índice de compactação de 0.79 (± 0.09 , $n = 145$), quando comparados a núcleos submetidos a P2-FISH, cujo índice de compactação foi 0.92 (± 0.03 , $n = 189$). É importante ressaltar que o índice de compactação de núcleos preparados de acordo com P2, mas não submetidos a FISH, foi de 0.95 (± 0.03 , $n = 16$ – ver figura 16C). Portanto, núcleos preparados por P1-FISH apresentam-se mais deformados, e portanto menos conservados, do que núcleos preparados por P2-FISH.

Figura 16. Núcleos de parasitas submetidos ao protocolo P1-FISH são mais deformados (menos compactos) do que núcleos de parasitas submetidos ao protocolo P2-FISH. (A) Exemplo de núcleos de parasitas (DNA corado com DAPI) utilizados para análise de deformação após serem submetidos ao protocolo P1 (esquerda) ou P2 (direita) e FISH. Barra, 2 μm . (B) Exemplos de núcleos segmentados automaticamente e utilizados para análise de compactação: o valor da área cinza de cada núcleo é computado para o cálculo do índice de compactação; um círculo teria um índice de compactação igual a 1. Os números de 1 – 5 e I – V correspondem aos núcleos visualizados em (A), em P1 e P2 respectivamente. Barra, 1 μm . (C) Índices de compactação do núcleo de parasitas submetidos a P1-FISH ($n = 145$), P2-FISH ($n = 189$), e preP2 (mesma fixação do P2, mas não submetidos a FISH; $n = 16$); quanto mais deformado o núcleo, menos compacto, e portanto menor o valor do índice. As barras verticais representam o desvio padrão das respectivas populações.



4.11 Análise automatizada de imagens em 3D mostra que P2-FISH resulta em volume nuclear mais conservado e menor variabilidade no número de *clusters* teloméricos

A fim de confirmar os dados medidos em 2D, analisamos as imagens 3D de forma automatizada, semelhante ao procedimento utilizado para fábricas de transcrição, descrito acima. Núcleos de P1- e P2-FISH foram hibridizados com sondas teloméricas e utilizados na aquisição de séries-Z em microscópio confocal, analisadas para detecção dos *clusters* teloméricos e medidas de volume.

De acordo com o que foi observado em microscopia de epifluorescência (figura 16), projeções 2D das séries-Z mostram que P1-FISH resulta em núcleos maiores e mais irregulares, quando comparados a núcleos preparados por P2-FISH (figura 17A). Nós também observamos que núcleos preparados por P1-FISH apresentavam muitas vezes ramificações, as quais normalmente não são visíveis em microscopia de epifluorescência, mas tais ramificações não foram observadas em núcleos submetidos a P2-FISH.

O volume aparente de núcleos de P1-FISH foi, em média, 15 ± 5.4 , enquanto que o volume médio de núcleos submetidos a P2-FISH foi 8.3 ± 2.3 (figura 17B). A diferença observada entre os volumes nucleares obtidos em cada uma das preparações mostrou-se estatisticamente significativa ($p=0.0001$). Portanto, não apenas P1-FISH leva à maior deformação do núcleo, mas também causa um aumento de volume e maior variabilidade na população, do que P2-FISH.

O aumento na deformação e volume nucleares observado em núcleos submetidos a P1-FISH pode ser ao menos parcialmente explicado pela etapa de desidratação à qual os eritrócitos infectados são submetidos antes da fixação. Em células humanas, por exemplo, desidratação/fixação por metanol e ácido acético causa achatamento do núcleo e aumento na superfície nuclear (Kozubek *et al.*, 2000). Embora não tenhamos observado achatamento, nossas observações de aumento na superfície e no volume nucleares vão ao encontro desses resultados. Por outro lado, núcleos

submetidos a P2-FISH foram sempre mantidos em suspensão e desidratações foram cuidadosamente evitadas durante toda a execução do FISH, evitando assim deformações e permitindo maior conservação da estrutura nuclear.

Outro fator que pode contribuir para maior conservação da morfologia e volume nucleares em P2-FISH é o protocolo de fixação. Em células humanas, o tipo de fixação é essencial para a manutenção da organização da cromatina durante a etapa de desnaturação do DNA, e paraformaldeído é o fixador de escolha para obter um balanço entre preservação da arquitetura nuclear em 3D e acessibilidade da sonda ao alvo de DNA (Cremer *et al.*, 2008; Hendzel & Bazett-Jones, 1997). Núcleos preparados por P1-FISH foram fixados por curtos períodos (15 min) à temperatura ambiente enquanto que núcleos preparados para P2-FISH foram fixados por longos períodos (aproximadamente 16 horas) a 4°C. Nós especulamos que a combinação de temperaturas baixas com períodos mais longos de fixação proporciona melhor conservação da estrutura nuclear durante a execução do FISH. Nossas conclusões estão de acordo com a literatura (Eneström & Kniola, 1992). Os autores deste trabalho demonstraram que células de adenohipófise apresentam maior conservação do seu formato esférico quando fixadas por 2 horas em glutaraldeído do que quando fixadas na mesma solução por apenas 15 minutos.

Recentemente, um protocolo de FISH otimizado foi sugerido por L. Mancio-Silva e A. Scherf (Mancio-Silva *et al.*, 2008a). Embora tenhamos incorporado a etapa de lise de eritrócitos infectados com saponina a fim de diminuir o *background* observado nas preparações, assim como a fixação em solução, observamos que períodos de fixação mais longos resultam em uma melhor conservação da estrutura nuclear quando comparados com a proposta fixação de 15 min (dados não mostrados). É importante ressaltar que períodos ainda mais longos de fixação (mais de 48 h) devem ser evitados pois também podem causar maior deformação dos núcleos (dados não mostrados). Além disso, o protocolo proposto por Mancio-Silva e Scherf também utiliza desidratação, contudo realizada após o período de fixação. Embora esta opção não tenha sido comparada com nosso P2-FISH em termos de conservação da estrutura nuclear, especulamos que da mesma

forma que em P1-FISH, a desidratação causará deformações na estrutura nuclear.

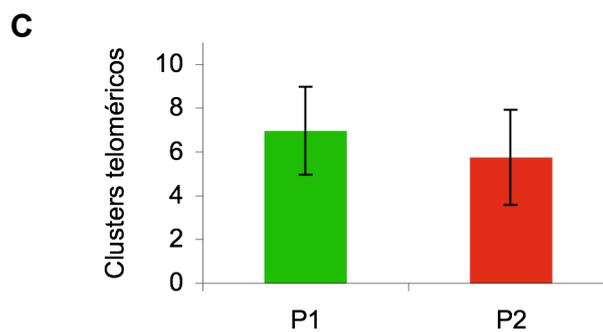
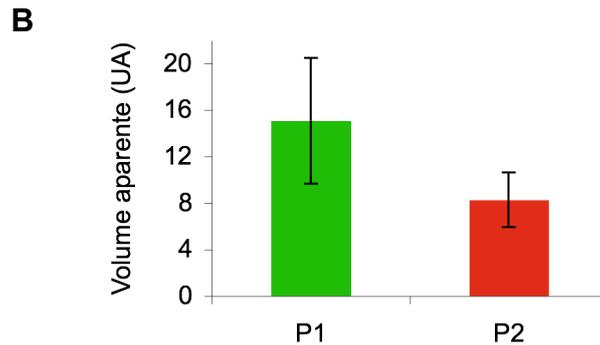
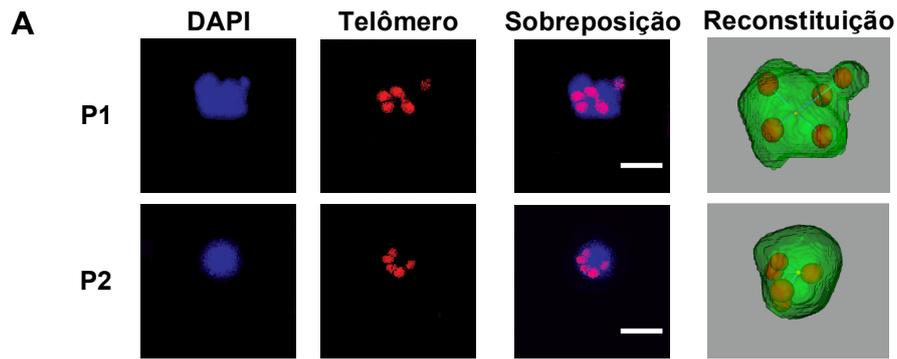


Figura 17. Parasitas submetidos a P1- apresentam núcleos mais largos e maior número de sinais teloméricos que parasitas submetidos a P2-FISH.

(A) Projeção 2D de séries-Z (confocal) de parasitas submetidos a P1- e a P2-FISH. O núcleo foi corado com DAPI (em azul) e os telômeros foram detectados por sonda específica (em vermelho). As fotos são exemplos representativos das respectivas populações. À esquerda, reconstituição automatizada da projeções 2D. Barra, 1 μ m. (B) O volume aparente (em unidades arbitrárias, AU) e (C) o número médio de sinais teloméricos de parasitas submetidos a P1- (verde, $n = 31$) e P2-FISH (vermelho, $n = 32$) foram medido de forma automatizada. As barras verticais representam o desvio padrão das respectivas populações.

4.12 Núcleos preparados por P2-FISH apresentam melhor preservação da distribuição periférica dos *clusters* teloméricos

Utilizando-se do P1-FISH, foi demonstrado que o núcleo do *P. falciparum* apresenta de 4 a 7 *clusters* teloméricos (Freitas-Junior *et al.*, 2000; Figueiredo *et al.*, 2002). Portanto, resolvemos analisar se há diferenças no número de *clusters* teloméricos detectados em 3D de forma automatizada em núcleos submetidos a P1- e a P2-FISH.

Houve diferença significativa ($p=0.0092$) entre o número médio de *clusters* detectados em ambos os casos: enquanto P1-FISH apresenta uma média de 7 *clusters* por núcleo, núcleos submetidos a P2-FISH apresentam em média 6 *clusters* por núcleo, indicando que um número diferentes de *clusters* é detectado dependendo do método utilizado na preparação das células para FISH.

Clusters teloméricos são estruturas estabilizadas por proteínas, e o tratamento do núcleo com detergentes brandos anteriormente ao FISH causa aumento no número de *clusters* detectados, sugerindo que a integridade da membrana nuclear seja importante para manutenção das associações entre as extremidades cromossômicas. Nós especulamos que a combinação da etapa de desidratação com o período mais curto de fixação em P1-FISH leva à desestabilização dos *clusters* e da membrana nuclear quando os núcleos são posteriormente submetidos a altas temperaturas necessárias para a desnaturação da cromatina.

Os *clusters* teloméricos localizam-se preferencialmente na periferia nuclear (Freitas-Junior *et al.*, 2000; Figueiredo *et al.*, 2002). Dadas as alterações observadas na estrutura nuclear e no número de *clusters* detectados em P1-FISH, nos perguntamos se há diferenças na distribuição nuclear dos mesmos em P1- e P2-FISH. A distância de cada *cluster* telomérico ao centro do núcleo foi medida conforme mostrado na figura 18A e explicado em detalhes em Material e Métodos. Brevemente, a distância de cada *cluster* ao centro do núcleo foi medida e normalizada de acordo com o raio médio nuclear, que foi considerado a distância máxima do centro à periferia do núcleo. Como esperado, o valor médio dos raios de núcleos de

P1-FISH foi quase duas vezes mais alto ($1.09 \mu\text{m} \pm 0.18$) do que o valor obtido para núcleos de P2-FISH ($0.65 \mu\text{m} \pm 0.07$). A posição normalizada de cada *cluster* foi então classificada de acordo com três zonas nucleares concêntricas de mesma área e, portanto, de iguais probabilidades de conter a mesma quantidade de *clusters* (ver Material e Métodos, figura 6F).

Quando a posição de centenas de *clusters* foi analisada tanto para núcleos submetidos a P1- quanto a P2-FISH, uma distribuição diferenciada foi observada entre ambos os casos. Embora os *clusters* estejam distribuídos por todo o núcleo em ambas preparações, em núcleos de P1-FISH observamos que os *clusters* tendem a localizar preferencialmente em regiões mais internas, enquanto que em núcleos de P2-FISH, os *clusters* localizam-se preferencialmente na zona mais periférica do núcleo (figura 18B). Esses dados sugerem que as mudanças na estrutura nuclear, que ocorrem em maior grau em preparações P1-FISH, causam a translocação dos *clusters* para áreas mais centrais.

A distribuição diferencial dos *clusters* observada em núcleos de P1-FISH pode ser, novamente, explicada pelas alterações na arquitetura nuclear e na estrutura de “ordem maior” da cromatina causadas pela etapa de desidratação, conforme mencionado acima. Quando centenas de núcleos escolhidos ao acaso são analisados para determinar a posição nuclear dos *clusters* teloméricos, a translocação dos *clusters* para áreas mais centrais tornou-se evidente. Conforme mencionado acima, a desidratação/fixação de leucócitos humanos por metanol/ácido acético causa aumento na superfície nuclear (Kozubek *et al.*, 2000). Os autores desse estudo também reportaram que a cromatina centromérica perinuclear é deslocada em direção à membrana nuclear nesses tipos de preparação, de forma que a distância absoluta entre os centrômeros e a membrana nuclear não muda quando comparada à mesma distância medida em células fixadas por paraformaldeído (que são preparações hidratadas). Contudo, a eucromatina localizada em áreas nucleares centrais não sofre um deslocamento proporcional em direção à membrana nuclear, resultando em distâncias relativas eucromatina-membrana maiores em células desidratadas do que em células hidratadas. Portanto, deslocamentos de componentes da cromatina – tal

como os *clusters* teloméricos – podem ocorrer quando há desidratação do núcleo.

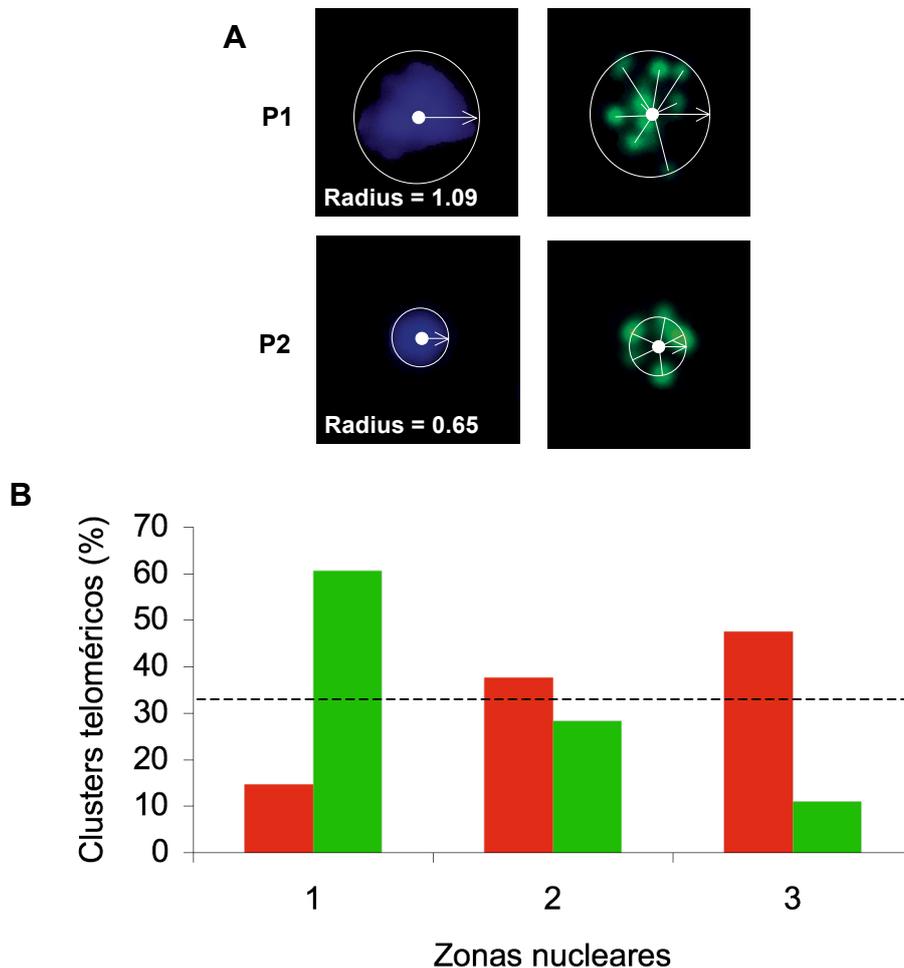


Figura 18. P1-FISH causa a redistribuição dos *clusters* teloméricos para zonas centrais. (A) À esquerda, representação esquemática da determinação da área e raio de núcleos, corados com DAPI, submetidos a P1- e P2-FISH; à direita, esquema mostrando como foi medida a posição de cada *cluster* telomérico em relação ao centro do núcleo. (B) Distribuição dos *clusters* teloméricos de parasitas submetidos a P1- (verde) e a P2-FISH (vermelho) nas zonas central (1), intermediária (2) e periférica (3) – ver Material e Métodos, figura 6F. A linha pontilhada horizontal mostra o limite de 33,3% de distribuição ao acaso. Tanto para P1- quanto para P2-FISH 50 núcleos foram analisados.

4.13 Um maior índice de colocalização entre sondas telomérica e de Rep20 é observado em núcleos de P2-FISH

A diferença observada no número e na distribuição dos *clusters* teloméricos entre parasitas submetidos a P1- e P2-FISH nos motivou a investigar o efeito que cada uma das preparações teria sobre os índices de colocalização de sondas telomérica e de Rep20. Telômeros e Rep20 encontram-se de 10 a 12 kb de distância, com exceção dos braços cromossômicos em que a repetição de Rep20 foi perdida (Figueiredo *et al.*, 2000). Devido a a natureza heterocromática e condensada das extremidades cromossômicas (Freitas-Junior *et al.*, 2005), assume-se que sondas de telômero e Rep20 colocalizam na maior parte do tempo quando utilizadas em experimentos de FISH.

Foram analisadas diversas imagens de epifluorescência de núcleos marcados simultaneamente para telômero e Rep20 e submetidos a P1- ou a P2-FISH. O número de sinais de cada sonda foi contado individualmente e ao mesmo tempo, a fim de analisar os índices de colocalização, conforme mostrado na figura 19 e na tabela 3.

Tabela 3. Quantificação do número de sinais de telômero e Rep20 detectados em P1- e P2-FISH de duas cores, e análise da porcentagem de colocalização total ou parcial, ou ausência de colocalização, entre as duas sondas.

	Número de sinais		Tipo de colocalização (%)		
	Telômero	Rep20	Ausência: NC	Parcial: PC	Total: TC
P1	7.6 ± 2.3	4.5 ± 1.5	30	43.5	26.5
P2	6.1 ± 1.5	5.9 ± 1.9	22	13	65

Da mesma maneira observada em detecção automatizada em imagens confocais 3D (figura 17), um maior número médio de sinais teloméricos foi detectado em núcleos de P1-FISH (7.6 ± 2.3) do que em núcleos de P2-FISH (6.1 ± 1.5). Entretanto, para Rep20 observou-se uma média menor de sinais detectados em núcleos de P1-FISH (4.5 ± 1.5) do que

em núcleos de P2-FISH (6.1 ± 1.5). Portanto, P1-FISH resulta em um número diferente de *clusters* detectados dependendo da sonda utilizada, enquanto que em P2-FISH, telômeros e Rep20 são detectados em taxas similares.

Os índices de ausência de colocalização (NC), colocalização parcial (PC) ou colocalização total (TC) entre as duas sondas foram classificados de acordo com os critérios exemplificados na figura 19B e normalizados para os sinais de Rep20, já que estes se apresentaram em menor número em núcleos de P1-FISH. Existe uma diferença clara de frequência de colocalização total entre sondas teloméricas e de Rep20 quando se utilizou P2-FISH (TC = 65%) e P1-FISH (TC = 26.5%). O valor máximo de colocalização parcial foi observado em núcleos de P1-FISH (43.5%), enquanto que núcleos de P2-FISH mostraram índices consideravelmente menores (13%). Consequentemente, núcleos submetidos a P1-FISH apresentaram índices de ausência de colocalização superiores (30%) a núcleos submetidos a P2-FISH (21%).

Conforme mencionado acima, a desidratação do núcleo leva à distorção da estrutura da cromatina, com diferentes domínios respondendo de forma diferenciada após a desidratação (Kozubek *et al.*, 2000). Nós especulamos que a desidratação dos núcleos de P1-FISH causa distorção da estrutura da cromatina e leva à mudança nas posições relativas de tratos teloméricos e de Rep20, explicando o baixo índice de colocalização total observado entre essas duas sondas quando núcleos são submetidos a P1-FISH. Dado que parasitas utilizados em ambos protocolos são sempre oriundos da mesma população, os altos índices de colocalização parcial/ausência de colocalização de sondas teloméricas e de Rep20 observados em núcleos de parasitas submetidos a P1-FISH devem ser atribuídos a alterações na estrutura nuclear e da cromatina em vez de diferenças entre populações devido à perda espontânea de regiões subteloméricas (Figueiredo *et al.*, 2002). Portanto, essas observações sugerem que etapas de desidratação devem ser totalmente evitadas durante a execução do FISH quando a posição relativa de *loci* de DNA e a arquitetura do núcleo são levadas em consideração.

Em resumo, a otimização da técnica de FISH aqui demonstrada permitirá, num futuro próximo, uma análise mais confiável da possível relação

especial que os genes co-regulados durante o ciclo eritrocítico de *P. falciparum* apresentam quando ativos.

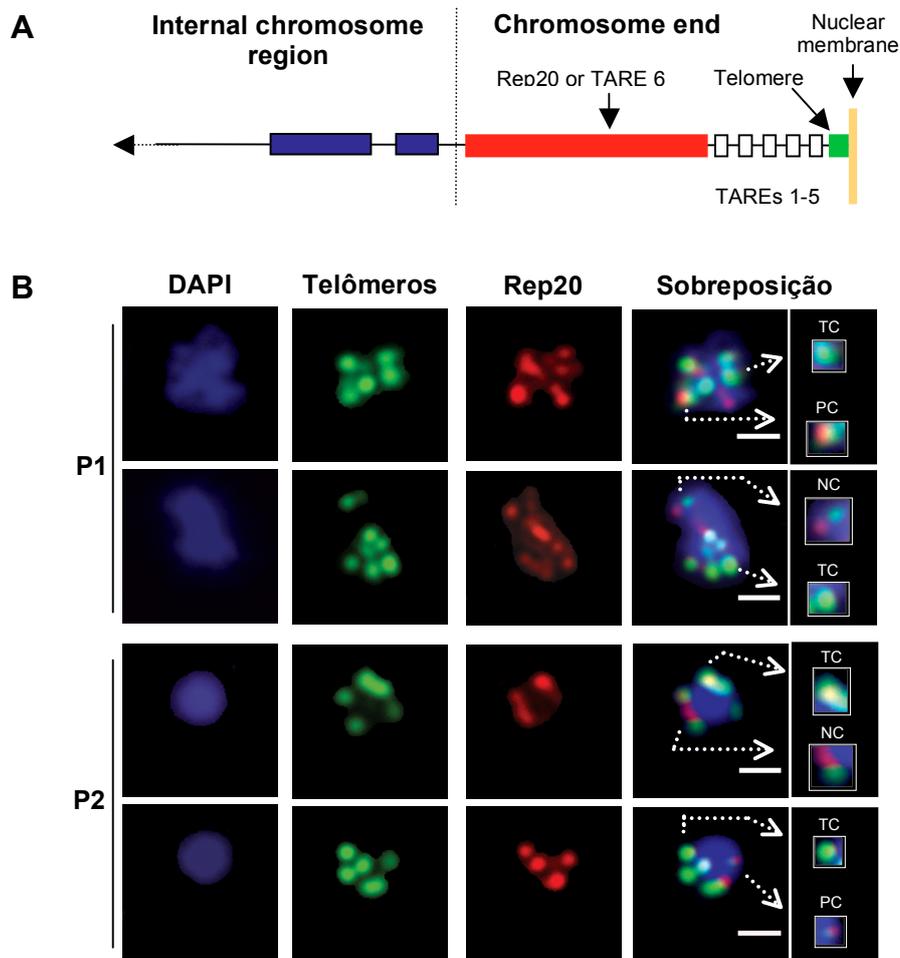


Figura 19. P2-FISH resulta em índices de colocalização telômero-Rep20 mais altos. (A) Esquema de uma extremidade cromossômica hipotética em *P. falciparum*, mostrando o telômero (retângulo verde) ancorado à membrana nuclear, seguido das TAREs 1 – 5 (retângulos brancos) e TARE6 ou Rep20 (retângulo vermelho). As distâncias e os tamanhos das repetições são proporcionais. (B) Exemplos representativos de núcleos submetidos a P1- e P2-FISH. O núcleo foi corado com DAPI, os telômeros foram detectados indiretamente por Alexa488 e Rep20 por Alexa555. Na coluna mais à direita encontram-se exemplos dos tipos de colocalização detectados: TC, colocalização total, e PC: colocalização parcial. A ausência de colocalização (NC) também foi medida (ver tabela 3). Barras, 1 μ m.

5. Conclusões e Perspectivas

Este trabalho é o primeiro a estudar a arquitetura global da transcrição nascente em *Plasmodium falciparum* bem como em outros parasitas protozoários. Usando ferramentas de informática desenvolvidas especialmente para esta aplicação, pudemos analisar, de forma automatizada e reproduzível, o número e a distribuição das fábricas de transcrição pelo núcleo do *P. falciparum*. Surpreendentemente, observamos remodelagem das fábricas ao longo do ciclo eritrocítico, sendo que anéis apresentam mais fábricas que trofozoítas. Ao contrário do que se observa em mamíferos, o número de fábricas não está relacionado ao volume nuclear, mas aparentemente está relacionado ao número de genes transcritos em uma dada fase. Também observamos uma redistribuição das fábricas em distintas zonas nucleares, sendo que em anéis a transcrição ocorre prioritariamente na zona periférica, enquanto que em trofozoítas as fábricas encontram-se igualmente distribuídas nas zonas nucleares central, intermediária e periférica. Estes dados são bastantes surpreendentes porque se acreditava que a zona periférica do núcleo de *P. falciparum* fosse prioritariamente uma zona de silenciamento. Assim como em mamíferos, a distribuição das fábricas está ligada à densidade da cromatina, sendo que a transcrição ocorre principalmente em áreas de baixa densidade de cromatina. Esses dados sugerem que a transcrição em *P. falciparum* ocorre na “superfície” dos espaços ocupados pelos cromossomos, os chamados “territórios de cromossomos” em outros organismos.

As fábricas de transcrição em *P. falciparum* definem um compartimento nuclear antes não descrito, diferente do compartimento definido por Sir2, Nop1 e marcações de histonas ativas (H4ac e H3K79me3). Esses dados sugerem, também, que a acetilação de histonas, ou a trimetilação da histona H3 na lisina 79, não estão diretamente ligadas à transcrição ativa.

Estudamos também a transcrição nucleolar, que é bastante peculiar. Na maior parte dos casos, observamos que na maior parte dos casos (74%), há apenas uma fábrica de transcrição de RNApoll, enquanto que em 19%

dos núcleos analisados havia duas fábricas de transcrição. A identidade da segunda fábrica de transcrição não foi ainda determinada e novos experimentos utilizando RNA-FISH serão necessários para melhor caracterizá-la.

Experimentos de DNA-FISH também serão importantes no estudo da distribuição de genes co-regulados em relação às fábricas de transcrição. Contudo, ao tentarmos utilizar os protocolos de FISH publicados para *P. falciparum*, observamos que a conservação da estrutura nuclear não era satisfatória. Portanto, foi necessário otimizar a técnica de FISH para este parasita. Usando análise automatizada de imagens, observamos que nosso novo protocolo, chamado de P2-FISH, propicia a melhor conservação da forma e do volume nucleares, bem como da distribuição periférica de *clusters* teloméricos, em relação ao protocolo anterior (P1-FISH). Além disso, o protocolo P2-FISH leva a um aumento nos índices de co-localização entre duas sondas proximais, telômero e Rep20. Esses dados sugerem, portanto, que a técnica de P2-FISH favorece a melhor conservação da estrutura nuclear e da cromatina durante o procedimento de FISH; atribuímos essas diferenças a fixações mais longas e ausência de etapa de desidratação no protocolo P2-FISH e, portanto, o novo protocolo desenvolvido permite obter resultados mais confiáveis em relação à distribuição nuclear de genes e domínios da cromatina. Num futuro próximo, esta técnica otimizada de FISH será utilizada, em combinação com a técnica denominada *chromosome conformation capture* (3C), no estudo da relação de genes co-regulados com fábricas de transcrição em *P. falciparum*, trazendo luz a este aspecto ainda obscuro mas importante da biologia deste parasita.

6. Referências Bibliográficas

- Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J. and Ram, S.J. (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, **11**, 36-42.
- Balaji, S., Babu, M.M., Iyer, L.M. and Aravind, L. (2005) Discovery of the principal specific transcription factors of Apicomplexa and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains. *Nucleic Acids Research*, **33**, 3994-4006.
- Bannister, L.H., Hopkins, J.M., Fowler, R.E., Krishna, S. and Mitchell, G.H. (2000) A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of *Plasmodium falciparum* Asexual Blood Stages. *Parasitology Today*, **16**, 427-433.
- Baruch, D.I., Pasloske, B.L., Singh, H.B., Bi, X., Ma, X.C., Feldman, M., Taraschi, T.F. and Howard, R.J. (1995) Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell*, **82**, 77-87.
- Bozdech, Z., Llinas, M., Pulliam, B.L., Wong, E.D., Zhu, J. and DeRisi, J.L. (2003) The Transcriptome of the Intraerythrocytic Developmental Cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biology*, **1**, e5.
- Brown, J.M., Green, J., das Neves, R.P., Wallace, H.A.C., Smith, A.J.H., Hughes, J., Gray, N., Taylor, S., Wood, W.G., Higgs, D.R., Iborra, F.J. and Buckle, V.J. (2008) Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment. *J. Cell Biol.*, **182**, 1083-1097.
- Brown, J.M., Leach, J., Reittie, J.E., Atzberger, A., Lee-Prudhoe, J., Wood, W.G., Higgs, D.R., Iborra, F.J. and Buckle, V.J. (2006) Coregulated human globin genes are frequently in spatial proximity when active. *Journal of Cell Biology*, **172**, 177-187.
- Callebaut, I., Prat, K., Meurice, E., Mornon, J.-P. and Tomavo, S. (2005) Prediction of the general transcription factors associated with RNA polymerase II in *Plasmodium falciparum*: conserved features and differences relative to other eukaryotes. *BMC Genomics*, **6**, 100.
- Carter, D.R., Eskiw, C. and Cook, P.R. (2008) Transcription factories. *Biochem Soc Trans*, **36**, 585-589.
- Cary, C., Lamont, D., Dalton, J.P. and Doerig, C. (1994) *Plasmodium falciparum* chromatin: Nucleosomal organisation and histone-like. *Parasitology Research*, **80**, 255-258.
- Chakrabarti, K., Pearson, M., Grate, L., Sterne-weiler, Deans, J., Donohue, J.P. and Ares Jr, M. (2007) Structural RNAs of known and unknown

- function identified in malaria by comparative genomics and RNA analysis. *RNA*, **13**, 1923-1938.
- Cheesman, S., Horrocks, P., Tosh, K. and Kilbey, B. (1998) Intraerythrocytic expression of topoisomerase II from *Plasmodium falciparum* is developmentally regulated. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **92**, 39-46.
- Chookajorn, T., Dzikowski, R., Frank, M., Li, F., Jiwani, A.Z., Hartl, D.L. and Deitsch, K.W. (2007) Epigenetic memory at malaria virulence genes. *PNAS*, **104**, 899-902.
- Cmarko, D., Verschure, P.J., Martin, T.E., Dahmus, M.E., Krause, S., Fu, X.-D., van Driel, R. and Fakan, S. (1999) Ultrastructural Analysis of Transcription and Splicing in the Cell Nucleus after Bromo-UTP Microinjection. *Molecular Biology of the Cell*, **10**, 211-223.
- Cook, P.R. (1999) The Organization of Replication and Transcription. *Science*, **284**, 1790-1795.
- Cox-Singh, J., Davis, T.M.E., Lee, K.-S., Shamsul, S.S.G., Matusop, A., Ratnam, S., Rahman, H.A., Conway, D.J. and Singh, B. (2008) *Plasmodium knowlesi* Malaria in Humans Is Widely Distributed and Potentially Life Threatening. *Clinical Infectious Diseases*, **46**, 165-171.
- Crabb, B.S. and Cowman, A.F. (1996) Characterization of promoters and stable transfection by homologous and non-homologous recombination in *Plasmodium falciparum*. *PNAS*, **93**, 7289-7294.
- Cremer, M., Grasser, F., Lanctôt, C., Müller, S., Neusser, M., Zinner, R., Solovei, I. and Cremer, T. (2008) Multicolor 3D Fluorescence *In situ* hybridization for Imaging Interphase Chromosomes. In *The Nucleus*, p. 205.
- Cremer, T., Cremer, M., Dietzel, S., Müller, S., Solovei, I. and Fakan, S. (2006) Chromosome territories - a functional nuclear landscape. *Current Opinion in Cell Biology*, **18**, 307-316.
- Cui, L., Miao, J., Furuya, T., Li, X., Su, X.Z. and Cui, L. (2007) PfGCN5-mediated histone H3 acetylation plays a key role in gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic Cell*, **6**, 1219-1227.
- de Koning, H.P., Bridges, D.J. and Burchmore, R.J.S. (2005) Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa: From biology to therapy. *FEMS Microbiology Reviews*, **29**, 987-1020.
- de Koning-Ward, T.F., Speranca, M.A., Waters, A.P. and Janse, C.J. (1999) Analysis of stage specificity of promoters in *Plasmodium berghei* using luciferase as a reporter. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **100**, 141-146.

- De Silva, E.K., Gehrke, A.R., Olszewski, K., Leon, I., Chahal, J.S., Bulyk, M.L. and Llinas, M. (2008) Specific DNA-binding by Apicomplexan AP2 transcription factors. *PNAS*, **105**, 8393-8398.
- Dechering, K.J., Kaan, A.M., Mbacham, W., Wirth, D.F., Eling, W., Konings, R.N.H. and Stunnenberg, H.G. (1999) Isolation and Functional Characterization of Two Distinct Sexual-Stage-Specific Promoters of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 967-978.
- Deitsch, K.W., Calderwood, M.S. and Wellems, T.E. (2001) Malaria: cooperative silencing elements in var genes. *Nature*, **412**, 875-876.
- Delves, C.J., Alano, P., Ridley, R.G., Goman, M., Holloway, S.P., Hyde, J.E. and Scaife, J.G. (1990) Expression of alpha and beta tubulin genes during the asexual and sexual stages of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **43**, 271-278.
- Dorval, T., Moraes, C.B., Ogier, A., Freitas-Junior, L.H. and Genovesio, A. (2009) Spatial Drift Correction Using Kalman Filtering in Fluorescence Based Imaging. *IEEE International Symposium on Biomedical Imaging*.
- Dossin, F.d.M., Dufour, A., Dusch, E., Siqueira-Neto, J., Moraes, C.B., Yang, G.S., Cano, M.I., Genovesio, A. and Freitas-Junior, L.H. (2008) Automated Nuclear Analysis of *Leishmania major* Telomeric Clusters Reveals Changes in Their Organization during the Parasite's Life Cycle. *PLoS ONE*, **3**, e2313.
- Dossin, F.d.M. and Schenkman, S. (2005) Actively Transcribing RNA Polymerase II Concentrates on Spliced Leader Genes in the Nucleus of *Trypanosoma cruzi*. *Eukaryotic Cell*, **4**, 960-970.
- Duraisingh, M.T., Voss, T.S., Marty, A.J., Duffy, M.F., Good, R.T., Thompson, J.K., Freitas-Junior, L.H., A., S., Crabb, B.S. and Cowman, A.F. (2005) Heterochromatin silencing and locus repositioning linked to regulation of virulence genes in *Plasmodium falciparum*. *Cell*, **121**, 13-24.
- Dzikowski, R., Li, F., Amulic, B., Eisberg, A., Frank, M., Patel, S., Wellems, T.E. and Deitsch, K.W. (2007) Mechanisms underlying mutually exclusive expression of virulence genes by malaria parasites. *EMBO reports*, **8**, 959-965.
- Eksi, S., Suri, A. and Williamson, K.C. (2008) Sex- and stage-specific reporter gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **160**, 148-151.
- Eneström, S. and Kniola, B. (1992) Short fixation-shock freezing and freeze-drying versus chemical fixation and dehydration: computer assisted image analysis of morphological variables and immunogold labeling

- density on pituitary secretory granules. *Biotech. Histochem.*, **67**, 268-287.
- Eskiw, C.H., Rapp, A., Carter, D.R. and Cook, P.R. (2008) RNA polymerase II activity is located on the surface of protein-rich transcription factories. *J Cell Sci*, **121**, 1999-2007.
- Faro-Trindade, I. and Cook, P.R. (2006a) A conserved organization of transcription during embryonic stem cell differentiation and in cells with high C value. *Mol Biol Cell*, **17**, 2910-2920.
- Faro-Trindade, I. and Cook, P.R. (2006b) Transcription factories: structures conserved during differentiation and evolution. *Biochemical Society Transactions*, **34**, 1133-1137.
- Figueiredo, L. and Scherf, A. (2005) *Plasmodium* telomeres and telomerase: the usual actors in an unusual scenario. *Chromosome Research*, **13**, 517-524.
- Figueiredo, L.M., Freitas-Junior, L.H., Bottius, E., Olivo-Marin, J.C. and Scherf, A. (2002) A central role for *Plasmodium falciparum* subtelomeric regions in spatial positioning and telomere length regulation. *EMBO J*, **21**, 815-824.
- Figueiredo, L.M., Pirrit, L.A. and Scherf, A. (2000) Genomic organisation and chromatin structure of *Plasmodium falciparum* chromosome ends. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **106**, 169-174.
- Figueiredo, L.M., Rocha, E.P.C., Mancio-Silva, L., Prevost, C., Hernandez-Verdun, D. and Scherf, A. (2005) The unusually large *Plasmodium telomerase* reverse-transcriptase localizes in a discrete compartment associated with the nucleolus. *Nucleic Acids Research*, **33**, 1111-1122.
- Flueck, C., Bartfai, R., Volz, J., Niederwieser, I., Salcedo-Amaya, A.M., Alako, B.T.F., Ehlgren, F., Ralph, S.A., Cowman, A.F., Bozdech, Z., Stunnenberg, H.G. and Voss, T.S. (2009) *Plasmodium falciparum* Heterochromatin Protein 1 Marks Genomic Loci Linked to Phenotypic Variation of Exported Virulence Factors. *PLoS Pathog*, **5**, e1000569.
- Frank, M., Dzikowski, R., Costantini, D., Amulic, B., Berdugo, E. and Deitsch, K. (2006) Strict pairing of var promoters and introns is required for var gene silencing in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 9942-9952.
- Freitas-Junior, L.H., Bottius, E., Pirrit, L.A., Deitsch, K.W., Scheidig, C., Guinet, F., Nehrbass, U., Wellems, T.E. and Scherf, A. (2000) Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **407**, 1018-1022.

- Freitas-Junior, L.H., Hernandez-Rivas, R., Ralph, S.A., Montiel-Condado, D., Ruvalcaba-Salazar, O.K., Rojas-Meza, A.P., Mancio-Silva, L., Leal-Silvestre, R.J., Gontijo, A.M., Shorte, S. and Scherf, A. (2005) Telomeric Heterochromatin Propagation and Histone Acetylation Control Mutually Exclusive Expression of Antigenic Variation Genes in Malaria Parasites. **121**, 25-36.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.-S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M.A., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M. and Barrell, B. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **419**, 498-511.
- Gopalakrishnan, A.M., Nyindodo, L.A., Ross Fergus, M. and López-Estraño, C. (2009) *Plasmodium falciparum*: Preinitiation complex occupancy of active and inactive promoters during erythrocytic stage. *Experimental Parasitology*, **121**, 46-54.
- Gunasekera, A.M., Myrick, A., Militello, K.T., Sims, J.S., Dong, C.K., Gierahn, T., Le Roch, K., Winzeler, E. and Wirth, D.F. (2007) Regulatory motifs uncovered among gene expression clusters in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **153**, 19-30.
- Hendzel, M.J. and Bazett-Jones, D.P. (1997) Fixation-dependent organization of core histones following DNA fluorescent in situ hybridization. *Chromosoma*, **106**, 114-123.
- Horrocks, P., Dechering, K. and Lanzer, M. (1998) Control of gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **95**, 171-181.
- Horrocks, P., Jackson, M., Cheesman, S., White, J.H. and Kilbey, B.J. (1996) Stage specific expression of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase [delta] from *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **79**, 177-182.
- Horrocks, P. and Lanzer, M. (1999) Differences in nucleosome organization over episomally located plasmids coincides with aberrant promoter activity in *P. falciparum*. *Parasitology International*, **48**, 55-61.
- Howitt, C.A., Wilinski, D., Llinas, M., Templeton, T.J., Dzikowski, R. and Deitsch, K.W. (2009) Clonally variant gene families in *Plasmodium falciparum* share a common activation factor. *Molecular Microbiology*, **73**, 1171-1185.

- Hozak, P., Cook, P.R., Schofer, C., Mosgoller, W. and Wachtler, F. (1994) Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells. *Journal of Cell Science*, **107**, 639-648.
- Iborra, F.J., Jackson, D.A. and Cook, P.R. (1998) The path of transcripts from extra-nucleolar synthetic sites to nuclear pores: transcripts in transit are concentrated in discrete structures containing SR proteins. *Journal of Cell Science*, **111**, 2269-2282.
- Issar, N., Ralph, S.A., Mancio-Silva, L., Keeling, C. and Scherf, A. (2009) Differential sub-nuclear localisation of repressive and activating histone methyl modifications in *P. falciparum*. *Microbes and Infection*, **11**, 403-407.
- Jackson, D.A., Hassan, A.B., Errington, R.J. and Cook, P.R. (1993) Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO Journal*, **12**, 1059-1065.
- Jackson, D.A., Iborra, F.J., Manders, E.M.M. and Cook, P.R. (1998) Numbers and Organization of RNA Polymerases, Nascent Transcripts, and Transcription Units in HeLa Nuclei. *Molecular Biology of the Cell*, **9**, 1523-1536.
- Kozubek, S., Lukasova, E., Amrichova, J., Kozubek, M., Liskova, A. and Slotova, J. (2000) Influence of Cell Fixation on Chromatin Topography. *Analytical Biochemistry*, **282**, 29-38.
- Lamond, A.I. and Spector, D.L. (2003) Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **4**, 605-612.
- Landeira, D. and Navarro, M. (2007) Nuclear repositioning of the VSG promoter during developmental silencing in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Biology*, **176**, 133-139.
- Lanzer, M., de Bruin, D. and Ravetch, J.V. (1992a) A sequence element associated with the Plasmodium falciparum KAHRP gene is the site of developmentally regulated protein-DNA interactions. *Nucleic Acids Res*, **20**, 3051-3056.
- Lanzer, M., de Bruin, D. and Ravetch, J.V. (1992b) Transcription mapping of a 100 kb locus of Plasmodium falciparum identifies an intergenic region in which transcription terminates and reinitiates. *EMBO J*, **11**, 1949-1955.
- Lanzer, M., de Bruin, D., Wertheimer, S.P. and Ravetch, J.V. (1994) Transcriptional and nucleosomal characterization of a subtelomeric gene cluster flanking a site of chromosomal rearrangements in *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4176-4182.

- Le Roch, K.G., Zhou, Y., Blair, P.L., Grainger, M., Moch, J.K., Haynes, J.D., De la Vega, P., Holder, A.A., Batalov, S., Carucci, D.J. and Winzeler, E.A. (2003) Discovery of Gene Function by Expression Profiling of the Malaria Parasite Life Cycle. *Science*, **301**, 1503-1508.
- Li, F., Sonbuchner, L., Kyes, S.A., Epp, C. and Deitsch, K.W. (2008) Nuclear non-coding RNAs are transcribed from the centromeres of *Plasmodium falciparum* and are associated with centromeric chromatin. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 5692-5698.
- Ling, J.Q., Li, T., Hu, J.F., Vu, T.H., Chen, H.L., Qiu, X.W., Cherry, A.M. and Hoffman, A.R. (2006) CTCF mediates interchromosomal colocalization between Igf2/H19 and Wsb1/Nf1. *Science*, **312**, 269-272.
- Llinas, M., Deitsch, K.W. and Voss, T.S. (2008) *Plasmodium* gene regulation: far more to factor in. *Trends in Parasitology*, **24**, 551-556.
- Lopez-Estrano, C., Semblat, J.-P., Gopalakrishnan, A.M., Turner, L., Mazier, D. and Haldar, K. (2007) *Plasmodium falciparum*: hrp3 promoter region is associated with stage-specificity and episomal recombination. *Experimental Parasitology*, **116**, 327-333.
- Lopez-Rubio, J.J., Gontijo, A.M., Nunes, M.C., Issar, N., Hernandez-Rivas, H. and Scherf, A. (2007) 5' flanking region of *var* genes nucleate histone modification patterns linked to phenotypic inheritance of virulence traits in malaria parasites. *Molecular Microbiology*, **66**, 1296-1305.
- Lopez-Rubio, J.J., Mancio-Silva, L. and Scherf, A. (2009) Genome-wide analysis of heterochromatin associates clonally variant gene regulation with perinuclear repressive centers in malaria parasites. *Cell Host Microbe*, **5**, 179-190.
- Maier, A.G., Cooke, B.M., Cowman, A.F. and Tilley, L. (2009) Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat Rev Micro*, **7**, 341-354.
- Mancio-Silva, L., Freitas-Junior, L.H. and Scherf, A. (2008a) Fluorescent in situ hybridization (FISH)^{DNA-DNA} for *Plasmodium falciparum*. In Moll, K., Ljungström, I., Perlmann, H., Scherf, A. and Wahlgren, M. (eds.), *Methods in Malaria Research*, Manassas, Virginia and Paris, France, Vol. 5th edition, pp. 223-224.
- Mancio-Silva, L., Rojas-Meza, A.P., Vargas, M., Scherf, A. and Hernandez-Rivas, R. (2008b) Differential association of Orc1 and Sir2 proteins to telomeric domains in *Plasmodium falciparum*. *J Cell Sci*, **121**, 2046-2053.
- Marty, A.J., Thompson, J.K., Duffy, M.F., Voss, T.S., Cowman, A.F. and Crabb, B.S. (2006) Evidence that *Plasmodium falciparum* chromosome end clusters are cross-linked by protein and are the sites of both

- virulence gene silencing and activation. *Molecular Microbiology*, **62**, 72-83.
- McCutchan, T.F., de la Cruz, V.F., Lal, A.A., Gunderson, J.H., Elwood, H.J. and Sogin, M.L. (1988) Primary sequence of two small subunit ribosomal RNA genes from *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **28**, 63-68.
- Merrick, C.J. and Duraisingh, M.T. (2007) *Plasmodium falciparum* SIR2: an unusual sirtuin with dual histone deacetylase and ADP-ribosyltransferase activity. *Eukaryotic Cell*, **6**, 2081-2091.
- Miao, J., Fan, Q., Cui, L., Li, J., Li, J. and Cui, L. (2006) The malaria parasite *Plasmodium falciparum* histones: Organization, expression, and acetylation. *Gene*, **369**, 53-65.
- Militello, K.T., Dodge, M., Bethke, L. and Wirth, D.F. (2004) Identification of regulatory elements in the *Plasmodium falciparum* genome. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **134**, 75-88.
- Militello, K.T., Patel, V., Chessler, A.D., Fisher, J.K., Kasper, J.M., Gunasekera, A. and Wirth, D.F. (2005) RNA polymerase II synthesizes antisense RNA in *Plasmodium falciparum*. *RNA*, **11**, 365-370.
- Militello, K.T., Refour, P., Comeaux, C.A. and Duraisingh, M.T. (2008) Antisense RNA and RNAi in protozoan parasites: Working hard or hardly working? *Molecular and Biochemical Parasitology*, **157**, 117-126.
- Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K. and Doumbo, O.K. (2002) The pathogenic basis of malaria. *Nature*, **415**, 673-679.
- Misteli, T. (2007) Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell*, **128**, 787-800.
- Mongelard, F., Vourc'h, C., Robert-Nicoud, M. and Usson, Y. (1999) Quantitative assessment of the alteration of chromatin during the course of FISH procedures. *Cytometry*, **36**, 96-101.
- Mourier, T., Carret, C., Kyes, S., Christodoulou, Z., Garder, P.P., Jeaffares, D.C., Pinches, R., Barrell, B., Berriman, M., Griffiths-Jones, S., Ivens, A., Newbold, C. and Pain, A. (2008) Genome-wide discovery and verification of novel structured RNAs in *Plasmodium falciparum*. *Genome Research*, **18**, 281-292.
- Navarro, M. and Gull, K. (2001) A pol I transcriptional body associated with VSG mono-allelic expression in *Trypanosoma brucei*. *Nature*, **414**, 759-763.

- Olivieri, A., Silvestrini, F., Sanchez, M. and Alano, P. (2008) A 140-bp AT-rich sequence mediates positive and negative transcriptional control of a *Plasmodium falciparum* developmentally regulated promoter. *International Journal for Parasitology*, **38**, 299-312.
- Oquendo, P., Goman, M., Mackay, M., Langsley, G., Walliker, D. and Scaife, J. (1986) Characterisation of a repetitive DNA sequence from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **18**, 89-101.
- Osborne, C.S., Chakalova, L., Brown, K.E., Carter, D., Horton, A., Debrand, E., Goyenechea, B., Mitchell, J.A., Lopes, S., Reik, W. and Fraser, P. (2004) Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet*, **36**, 1065-1071.
- Pierce, S.K. and Miller, L.H. (2009) World Malaria Day 2009: What Malaria Knows about the Immune System That Immunologists Still Do Not. *J Immunol* %R 10.4049/jimmunol.0804153, **182**, 5171-5177.
- Pombo, A., Jackson, D.A., Hollinshead, M., Wang, Z., Roeder, R.G. and Cook, P.R. (1999) Regional specialization in human nuclei: visualization of discrete sites of transcription by RNA polymerase III. *EMBO J*, **18**, 2241-2253.
- Ponzi, M., Pace, T., Dore, E. and Frontali, C. (1985) Identification of a telomeric DNA sequence in *Plasmodium berghei*. *EMBO Journal*, **4**, 2991-2995.
- Porter, M.E. (2002) Positive and negative effects of deletions and mutations within the 5' flanking sequences of *Plasmodium falciparum* DNA polymerase [delta]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **122**, 9-19.
- Pérez-Toledo, K., Rojas-Meza, A.P., Mancio-Silva, L., Hernández-Cuevas, N.A., Delgadillo, D.M., Vargas, M., Martínez-Calvillo, S., Scherf, A. and Hernandez-Rivas, R. (2009) *Plasmodium falciparum* heterochromatin protein 1 binds to tri-methylated histone 3 lysine 9 and is linked to mutually exclusive expression of var genes. *Nucleic Acids Research*, **37**, 2596-2606.
- Ralph, S.A., Scheidig-Benatar, C. and Scherf, A. (2005) Antigenic variation in *Plasmodium falciparum* is associated with movement of var loci between subnuclear locations. *Proc Natl Acad Sci*, **102**, 5414-5419.
- Ralph, S.A. and Scherf, A. (2005) The epigenetic control of antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Current Opinion in Microbiology*, **8**, 434-440.
- Ruvalcaba-Salazar, O.K., Ramirez-Estudillo, M., Montiel-Condado, D., Recillas-Targa, F., Vargas, M. and Hernandez-Rivas, R. (2005) Recombinant and native *Plasmodium falciparum* TATA-binding-protein

- binds to a specific TATA box element in promoter regions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **140**, 183-196.
- Salcedo-Amaya, A.M., van Driel, M.A., Alako, B.T., Trelle, M.B., van den Elzen, A.M., Cohen, A.M., Janssen-Megens, E.M., van de Vegte-Bolmer, M., Selzer, R.R., Iniguez, A.L., Green, R.D., Sauerwein, R.W., Jensen, O.N. and Stunnenberg, H.G. (2009) Dynamic histone H3 epigenome marking during the intraerythrocytic cycle of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**, 9655-9660.
- Scherf, A., Hernandez-Rivas, R., Buffet, P., Bottius, E., Benatar, C., Pouvelle, B., Gysin, J. and Lanzer, M. (1998) Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*. *EMBO Journal*, **17**, 5418-5426.
- Scherf, A., Lopez-Rubio, J.J. and Riviere, L. (2008) Antigenic Variation in *Plasmodium falciparum*. *Annual Review of Microbiology*, **62**, 445-470.
- Shiels, C., Adams, N.M., Islam, S.A., Stephens, D.A. and Freemont, P.S. (2007) Quantitative Analysis of Cell Nucleus Organisation. *PLoS Comput Biol*, **3**, e138.
- Shock, J., Fischer, K. and DeRisi, J. (2007) Whole-genome analysis of mRNA decay in *Plasmodium falciparum* reveals a global lengthening of mRNA half-life during the intra-erythrocytic development cycle. *Genome Biology*, **8**, R134.
- Silvestrini, F., Bozdech, Z., Lanfrancotti, A., Giulio, E.D., Bultrini, E., Picci, L., deRisi, J.L., Pizzi, E. and Alano, P. (2005) Genome-wide identification of genes upregulated at the onset of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **143**, 100-110.
- Simonis, M., Klous, P., Splinter, E., Moshkin, Y., Willemsen, R., de Wit, E., van Steensel, B. and de Laat, W. (2006) Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). *Nature Genetics*, **38**, 1348-1354.
- Smith, J.D., Chitnis, C.E., Craig, A.G., Roberts, D.J., Hudson-Taylor, D.E., Peterson, D.S., Pinches, R., Newbold, C.I. and Miller, L.H. (1995) Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell*, **82**, 101-110.
- Solovei, I., Cavallo, A., Schermelleh, L., Jaunin, F., Scasselati, C., Cmarko, D., Cremer, C., Fakan, S. and Cremer, T. (2002) Spatial Preservation of Nuclear Chromatin Architecture during Three-Dimensional Fluorescence in Situ Hybridization (3D-FISH). *Experimental Cell Research*, **276**, 10-23.

- Spilianakis, C.G., Lalioti, M.D., Town, T., Lee, G.R. and Flavell, R.A. (2005) Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature*, **435**, 637-645.
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J.-M., Menard, R. and Heussler, V.T. (2006) Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science*, **313**, 1287-1290.
- Su, X., Heatwole, V.M., Wertheimer, S.P., Guinet, F., Herrfeldt, J.A., Peterson, J.A., Ravetch, J.A. and Wellems, T.E. (1995) The large diverse gene family *var* encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell*, **82**, 89-100.
- Sutherland, H. and Bickmore, W.A. (2009) Transcription factories: gene expression in unions? *Nature Reviews Genetics*, **10**, 457-466.
- Tarun, A.S., Peng, X., Dumpit, R.F., Ogata, Y., Silva-Riveira, H., Camargo, N., Daly, T.M., Bergman, L.W. and Kappe, H.I. (2008) A combined transcriptome and proteome survey of malaria liver stages. *PNAS*, **105**, 305-310.
- Tonkin, C.J., Carret, C.K., Duraisingh, M.T., Voss, T.S., Ralph, S.A., Hommel, M., Duffy, M.F., Silva, L.M.d., Scherf, A., Ivens, A., Speed, T.P., Beeson, J.G. and Cowman, A.F. (2009) Sir2 Paralogues Cooperate to Regulate Virulence Genes and Antigenic Variation in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol*, **7**, e1000084.
- van Noort, V. and Huynen, M.A. (2006) Combinatorial gene regulation in *Plasmodium falciparum*. *Trends in Genetics*, **22**, 73-78.
- Volz, J., Carvalho, T.G., Ralph, S.A., Gilson, P., Thompson, J., Tonkin, C.J., Langer, C., Crabb, B.S. and Cowman, A.F. (2009) Potential epigenetic regulatory proteins localise to distinct nuclear sub-compartments in *Plasmodium falciparum*. *International Journal for Parasitology*, **in press**.
- Voss, T.S., Healer, J., Marty, A.J., Duffy, M.F., Thompson, J.K., Beeson, J.G., Reeder, J.C., Crabb, B.S. and Cowman, A.F. (2006) A *var* gene promoter controls allelic exclusion of virulence genes in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, **439**, 1004-1008.
- Voss, T.S., Tonkin, C.J., Marty, A.J., Thompson, J.K., Healer, J., Crabb, B.S. and Cowman, A.F. (2007) Alterations in local chromatin environment are involved in silencing and activation of subtelomeric *var* genes in *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, **66**, 139-150.

- Wansink, D., Schul, W., van der Kraan, I., van Steensel, B., van Driel, R. and de Jong, L. (1993) Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *Journal of Cell Biology*, **122**, 283-293.
- Waters, A.P., Syin, C. and McCutchan, T.F. (1989) Developmental regulation of stage-specific ribosome populations in *Plasmodium*. *Nature*, **342**, 438-440.
- Waters, A.P., van Spaendonk, R.M., Ramesar, J., Vervenne, R.A., Dirks, R.W., Thompson, J. and Janse, C.J. (1997) Species-specific regulation and switching of transcription between stage-specific ribosomal RNA genes in *Plasmodium berghei*. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 3583-3589.
- Waters, A.P., White, W. and McCutchan, T.F. (1995) The structure of the large subunit rRNA expressed in blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **72**, 227-237.
- Wesseling, J.G., Snijders, P.J.F., van Someren, P., Jansen, J., Smits, M.A. and Schoenmakers, J.G.G. (1989) Stage-specific expression and genomic organization of the actin genes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **35**, 167-176.
- White, N.J. (2008) *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite. *Clinical Infectious Diseases*, **46**, 172-173.
- Würtele, H. and Chartrand, P. (2006) Genome-wide scanning of HoxB1-associated loci in mouse ES cells using an open-ended Chromosome Conformation Capture methodology. *Chromosome Research*, **14**, 477-495.
- Xu, M. and Cook, P.R. (2008) Similar active genes cluster in specialized transcription factories. *J Cell Biol*, **181**, 615-623.
- Young, J., Johnson, J., Benner, C., Yan, S.F., Chen, K., Le Roch, K., Zhou, Y. and Winzeler, E. (2008) In silico discovery of transcription regulatory elements in *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics*, **9**, 70.
- Young, J.A., Fivelman, Q.L., Blair, P.L., de la Vega, P., Le Roch, K.G., Zhou, Y., Carucci, D.J., Baker, D.A. and Winzeler, E.A. (2005) The *Plasmodium falciparum* sexual development transcriptome: A microarray analysis using ontology-based pattern identification. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **143**, 67-79.
- Yuda, M., Iwanaga, S., Shigenobu, S., Mair, G.R., Janse, C.J., Waters, A.P., Kato, T. and Kaneko, I. (2009) Identification of a transcription factor in the mosquito-invasive stage of malaria parasites. *Molecular Microbiology*, **71**, 1402-1414.

- Zhao, Z., Tavoosidana, G., Sjölander, M., Göndör, A., Mariano, P., Wang, S., Kanduri, C., Lezcano, M., Sandhu, K.S., Singh, U., Pant, V., Tiwari, V., Kurukuti, S. and Ohlsson, R. (2006) Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nature Genetics*, **38**, 1341-1347.
- Zirbel, R.M., Mathieu, U.R., Kurz, A., Cremer, T. and Lichter, P. (1993) Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries. *Chromosome Research*, **1**, 93-106.

7. Anexos

I. Standardization of fluorescence *in situ* hybridization protocol for the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*

Manuscrito a ser submetido para publicação em revista indexada

II. *In situ* visualization of *Plasmodium falciparum* RNA synthesis sites

Pôster apresentado no 16th Molecular Parasitology Meeting, 2005

III. *Plasmodium falciparum* transcription sites in the context of nuclear architecture

Pôster apresentado no 17th Molecular Parasitology Meeting, 2006

IV. Spatial organization of transcription as a potential gene regulation mechanism in *Plasmodium falciparum*

Pôster apresentado no Molecular Approaches to Malaria Meeting, 2008

V. Automated nuclear analysis of *Leishmania major* telomeric clusters reveals changes in their organization during the parasite's life cycle

Trabalho publicado em 2008. *PLoS One* 3: e2313.

VI. 3D Spatial drift correction using Kalman filtering for fluorescence based imaging

Trabalho completo publicado nos anais do IEEE International Symposium on Biomedical Imaging, 2009

Standardization of fluorescence *in situ* hybridization protocol for the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*

Monica Contreras-Dominguez^{1#}, Carolina Borsoi Moraes^{1,4#}, Thierry Dorval^{2,3}
Auguste Genovesio³ and Lucio H. Freitas-Junior^{1*}

¹Systems Biology of Pathogens Group, Center for Neglected Diseases Drug Discovery, ²Cellular Differentiation Team and ³Image Mining Group, Institut Pasteur Korea, Sampyeong-dong 696, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 463-400, South Korea; ⁴Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu, 862, São Paulo 04023-062, Brazil

These authors contributed equally

*Corresponding author email: freitasjunior@ip-korea.org

Running title: Optimized FISH protocol for *P. falciparum*

Abstract

Fluorescence in situ hybridization (FISH) has been extensively used in the study of nuclear organization and gene positioning in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. While performing FISH with published protocols, we observed great variation in the parasite nuclear morphology. We asked if these inconsistencies were due to the type of parasite preparation used prior to FISH development. Using automated image analysis, we show that after FISH, *P. falciparum* nuclei dehydrated by air-drying and fixed for short periods at room temperature, present higher intra-population variation of nuclear shape and volume, as well as almost two-times higher relative volume values than parasite nuclei fixed in suspension for long periods at low temperatures. We also observe that, compared to air-dried/short-fixed nuclei, longer fixation in suspension leads to improved conservation of the nuclear structure, with chromosome end clusters preferentially locating at the nuclear periphery, and higher colocalization indexes for two adjacent chromosome end probes, Rep20 and telomere.

Introduction

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is a powerful technique that allows visualization of specific nucleic acid sequences in the cell nucleus. Developed over 30 years ago, it has been specialized in several ways and its applications range from clinical genetics and diagnostics to basic research on the spatial organization of chromosomes and gene loci (1).

During the last decade, FISH has been widely used in the malaria field for visualization of specific DNA sequences in the nucleus of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. About half of the world population is at risk of malaria, the cause of approximately one million deaths every year worldwide. So far the lack of efficient vaccines and the widespread emergence of drug-resistant parasites have hindered effective disease control and much research is needed to elucidate parasite biology and mechanisms of virulence. One of the most studied aspects of malaria is antigenic variation of the *P. falciparum* major virulence factor PfEMP1, and the *var* multigene family, which encodes for PfEMP1. The *var* gene family is subject to mutually exclusive expression [reviewed by (2)], meaning that only one of approximately 60 members of the family is expressed at a given time in a single parasite.

DNA-FISH was originally developed for *P. falciparum* for the visualization of chromosome ends, which are adjacent to members of the *var* gene family (3). This work showed for the first time that *P. falciparum* telomeres form clusters that are tethered to the nuclear periphery, in an arrangement that may favor the recombination of *var* genes and thus increase the *var* repertoire for antigenic variation. This study was also the first to hint that the parasite nucleus is organized into functional subdomains. Since then, DNA-FISH has been widely applied to the study of nuclear compartmentalization, gene positioning and the molecular mechanisms of the mutually exclusive expression of *var* genes. It has been shown that chromosome end clusters associate with silencing factors (4-6) but are not associated with active chromatin (4). DNA-FISH has also been employed in the study of chromatin compactation in different regions of the same chromosome (4), detection of centromeric DNA (7) and, more extensively, in the study of *var* gene positioning in the nucleus. It has been shown that *var* genes locate to the nuclear periphery and all studies so far support the existence of a compartment for *var* gene activation/transcription in this nuclear region (8-15). However, whether active *var* genes localize to telomeric clusters (10,11) or must be translocated to an active area of the nuclear periphery upon activation (8,13,14) still remains controversial. It was suggested that the differences observed between laboratories could be at least partially explained by technical differences in the FISH protocol used (11).

When first established, DNA-FISH of *P. falciparum* involved spreading of infected red blood cells (iRBCs) on a glass slide followed by air-drying (3). When performing this protocol, we observed inconsistent alterations of the nuclear morphology, such as irregularly shaped nuclear contour and nuclear ramifications that are not usually observed in other fluorescence-based procedures such as immunofluorescence carried out in suspension. We also consistently observed that authentic FISH signals often localized far from the nuclear border, defined by DNA staining. This fact prompted us to establish

an alternative protocol that would allow improved nuclear structure conservation.

To establish an alternative protocol for FISH in *P. falciparum*, we opted to use probes for telomeric and Rep20 repeats. In the 3D7 strain, telomeres are comprised of GGGTT(T/C)A repeat tracts of 1650 bp on average, followed by a non-coding sub-telomeric region of 15~30 kb, composed of six highly conserved regions called telomere-associated repetitive elements (TAREs) (16-18). TAREs are classified from TARE 1 to 6, TARE 6 also being referred to as Rep20 (19). This is the largest subtelomeric repeat with total length of 6 to 23 kb depending on the chromosome arm (17). Given their length and ubiquitous chromosomal distribution, telomeric and Rep20 repeats produce very robust DNA-FISH probes, making them ideal candidates for DNA-FISH protocol improvement.

In this study, we quantify the differences obtained using two types of parasite preparation prior to FISH. Using automated image analysis, we show that our improved protocol leads to better conservation of nuclear shape and volume and decreases nucleus-to-nucleus volume variation. We also show that the improved fixation protocol leads to enhanced concentration of telomeric clusters at the nuclear periphery, and increases the co-localization index of telomeric and subtelomeric probes. Overall, the results indicate that our alternative protocol dramatically improves conservation of the nuclear architecture when compared to previously reported *Plasmodium* DNA-FISH.

Materials and Methods

Parasites: *P. falciparum* 3D7 was cultivated according to standard conditions (20). Synchronized ring-stage parasites (~10 hpi) were used for these studies. Briefly, mature schizont infected red blood cells (iRBCs) were first enriched for by 0.7% gelatin/RPMI treatment, cultured with fresh red blood cells (RBCs) for a period of 4 h to allow invasion, and then treated with 5% sorbitol to eliminate mature parasites. Synchronized cultures used for FISH typically had 5 to 10% parasitemia.

Fixation protocols: Parasites were prepared in two different ways for FISH. In both cases, microscope glass slides were cleaned with methanol and air-dried prior to parasite deposition. In all experiments, both fixation procedures were carried out in parallel from synchronous populations (~ 10 hpi) in order to minimize nucleus-to-nucleus variation in size and shape due to parasite developmental age. Unless mentioned otherwise, all procedures were carried out at room temperature. In the first protocol (P1), correspondent to traditional FISH (3), culture containing iRBC was washed in PBS pH 7.4 and deposited as thin blood films on microscope slides previously cleaned with methanol. Slides were air-dried 16~20 h in a dry chamber (containing silica gel beads), and subsequently fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde prepared in PBS pH 7.4 (PFA/PBS) in a humid chamber. Then, fixed air-dried parasites were washed 3 times in PBS. This fixation procedure is designed as protocol 1 (P1). In the second procedure (P2), one volume of iRBCs pellet was resuspended in nine volumes of 0.15% saponin in ice-cold PBS pH7.4. The cell suspension was incubated in ice bath for 5 min for complete lysis of RBCs. Then parasites were centrifuged at 2500×g for 10 min at 4°C, washed two times in ice-cold PBS, and fixed in PFA/PBS at 5x10⁸/ml for 16~20 h at 4°C. Fixed suspension of parasites was washed with cold PBS and parasites were resuspended at 5x10⁸/ml in PBS. This fixation procedure was designed as protocol 2 (P2). Parasite suspension was deposited on slides and left to adhere to the glass for 1 h in a humid chamber.

FISH: FISH was performed as reported (3,21) with minor modifications. Throughout the following steps, drying of parasites was avoided. Briefly, P1 and P2 were permeabilized in 0.1% Triton X-100/PBS for 5 min followed by three PBS washes. Then, P1 and P2 slides were equilibrated in hybridization solution (50% formamide, 10% dextran sulfate, 2X SSPE, 250 µg/ml salmon sperm DNA) in a humid chamber for 30 min at 37°C. In parallel, FISH probes were resuspended in appropriate concentration in hybridization solution, denaturated at 95°C for 10 min and immediately placed into ice bath for at least 5 min. After applying the probes, the slides were sealed with plastic frames and denaturated at 80°C for 30 min, followed by overnight hybridization at 37°C. Post-hybridization, slides were rinsed in 50% formamide/2X SSC for 30 min at 37°C and consecutively the following washes were performed at 50°C: 1x SSC, 15 min; 2X SSC, 15 min; and 4X SSC, 15 min. The following steps were carried out in a humid chamber at room temperature. Slides were blocked with 4% BSA in PBS (BSA/PBS), and then incubated with mouse anti-digoxigenin (Sigma) at 1:300 dilution in

BSA/PBS for 45 min. Then the slides were washed with 0.5% Tween 20, 150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl for 10 min and incubated with donkey anti-mouse IgG Alexa 555 (Invitrogen) at 1:500 in BSA/PBS for 45 min. Slides were rinsed once with wash solution, nuclei were counterstained with DAPI and mounted in Vectashield. Both P1 and P2 nuclei were then referred to as P1-FISH and P2-FISH to indicate that FISH was carried out after fixation.

Image acquisition: Two-dimensional images were acquired using a Nikon Eclipse 90i microscope using an oil-immersion 100x/1.4 Plan ApoVC lens, a Nikon DS-QiMc camera and the NIS-Elements AR Software. Importantly, pixel values were kept inside the dynamic range of the camera by applying camera autoexposure combined with LUTs function available in the NIS-Elements software.

For automated analysis of nuclear volumes and telomeric cluster counting, three-dimensional stack images were acquired with a Leica TCS SP2 AOBs equipped with a 63x oil/HCX 1.4 PL Apo lbdBL objective. Pinhole was set to 1.00 airy and both channels were acquired simultaneously by two independent PMTs. A green DPSS laser was used for excitation of telomere indirectly labeled with Alexa 555 at 561 nm and emission was detected at 570-645 nm. For DAPI imaging excitation was carried out with a laser diode at 405 nm and emission was recorded at 415-485 nm. Stacks were composed by averaging 16 frames of 512-512 pixels, 8 bit, with voxel size corresponding to 58x58x122 nm. Post-acquisition, 2D and 3D images were assembled, treated for background removal (rolling ball radius 50) and contrast enhancement with ImageJ software.

Automated image analysis: The roundness index was automatically computed after user selection of the object of interest in the 2D image. The object intensity is segmented using the automated k-means clustering method. The contour points of the object are extracted and used to compute the compactness C (also called roundness) using the following equation: $C = (\text{Surface} \cdot 4\pi) / (\text{Perimeter})^2$. This value is maximized at 1 for a circle and is lower for a less compact object. This factor allows a quantitative evaluation of the object boundary fuzziness.

A customized algorithm performed 3D assembling of confocal series in order to quantify the nuclear volume and the number of telomeric clusters per nucleus in both P1- and P2-FISH preparations. Telomeric clusters were automatically identified as previously described, with minor modifications (22). The nuclear volume was automatically determined by using the k-means clustering method. The Student's t -test was applied to measure the differences between nuclear volume and number of clusters detected in P1- and P2-FISH preparations. In both cases, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Analysis of telomeric clusters distribution: The Nikon Elements Software (NIS-Elements AR version 3.0) was used to measure the radius of the nucleus and the distance between the centre of each telomeric cluster to the centre of the nucleus in 2D images. Briefly, the radius of each nucleus was extracted by automatically fitting a circle on the outlined edge of the DAPI signal. In total,

50 nuclei from both P1- and P2-FISH parasites each had their radii measured and an average radius value was computed for each population. The distance from the centre of each telomeric cluster to the nuclear centre was then measured and normalized to the respective population mean radius. Depending on their normalized position, each cluster was assigned to one of the three concentric nuclear zones of equal surface, as shown in figure 3.

Colocalization analysis for two color-FISH: To assess the colocalization index for two-color FISH using telomere and Rep20 probes (figure 4), 2D images acquired as mentioned above were also analyzed using NIS-elements software. Each telomeric and Rep20 spot was independently scored and then merged images of both channels were scored for colocalization indexes normalized by Rep20 spots, that were usually found in smaller numbers than telomeric ones. Spots that fell outside the DAPI signal were only considered as part of a given nucleus if they minimally overlapped the “raw” DAPI signal from that nucleus. Total colocalization was scored when the two spots had more than 80% overlap; partial colocalization was scored when the two spots were partially overlapping (between 20 and 80% overlap), and non-colocalization was assigned when the two spots did not overlap, even when they were adjacent to each other – which happens quite often given the small size of *P. falciparum* nucleus and the relatively large number of telomeric and Rep20 spots.

Results

A new fixation protocol for FISH results in dramatically improved nuclear conservation

Typical FISH procedure requires a series of different steps including dehydration, fixation, DNA denaturation and hybridization. Some of these steps can affect the nuclear ultrastructure (23-25). When performing air-drying of iRBCs prior to fixation (P1, see Material and Methods), we consistently observed alteration of nuclear morphology and localization of genuine FISH signals relatively far from the nucleus delimited by the DAPI signal on 2D images. We hypothesized the pre-FISH treatment of air-drying and fixation did not allow proper nuclear structure conservation during FISH and decided to look for an alternative fixation protocol. We found that, at least qualitatively, longer (~ 16 h) fixations of cells in suspension at low temperatures would result in sharper, more spherical nuclei (P2) after FISH procedure, resembling *P. falciparum* nuclear morphology usually observed when performing other non-denaturing techniques such as immunofluorescence in suspension.

In order to quantify the differences in nuclear volume observed between P1- and P2-FISH we applied automated image analysis to measure the shape and deformation of nuclei by computing the roundness index of the DAPI signal (figure 1). As expected, nuclei submitted to P1-FISH showed a higher degree of deformation, with a roundness index of 0.79 (± 0.09 , $n = 145$), compared to nuclei submitted to P2-FISH, whose index was 0.92 (± 0.03 , $n = 189$). Importantly, nuclei prepared as for P2 but not submitted to FISH have a roundness index of 0.95 (data not shown). Therefore, nuclei prepared by P1 become more deformed (hence less round) after FISH than nuclei prepared by P2.

This data was confirmed by measuring the nuclear volume of both preparations. Nuclei were submitted to either P1- or P2-FISH. Telomeric probes were used for the detection of chromosome end clusters. Confocal series of nuclei from P1- and P2- FISH were automatically analyzed for the detection of the *P. falciparum* nucleus and telomeric clusters. Two-dimensional projections from confocal Z-series of typical P1 and P2 preparations for telomere FISH and automated modeling (figure 2) show that P1-FISH results in larger, less regularly shaped nuclei, when compared to P2-FISH, which showed better preservation of its round shape. We also consistently observed nuclear ramifications in P1-FISH, that are not usually visible by epifluorescence microscopy but became visible in confocal Z-series, but such ramifications were not seen in P2-FISH nuclei (data not shown). When measured in 3D, relative volume of nuclei from P1-FISH had an average value of 15 ± 5.4 , while P2-FISH nuclei had an average value of 8.3 ± 2.3 (figure 2B). A *t*-test revealed this difference to be statistically significant ($p=0.0001$). This shows that P1-FISH not only causes the nucleus to swell and deform but also leads to higher intra-population measurement variation in terms of nuclear volume, confirming the 2D shape variations observed in figure 1B.

Nuclei prepared by P2-FISH have better preservation of the peripheral distribution of telomeric clusters

We then hypothesized if there would be changes in the number of telomeric clusters counted in 3D in both preparations. An automated algorithm to find and count telomeres spots detected by FISH was applied (figure 2C). There was significant difference ($p=0.0092$) in the detection of telomere signals counted by the software for P1- (average 7 clusters/nucleus) and P2-FISH (average 6 clusters/nucleus). This indicates that a different number of clusters is detected depending on the preparation applied to the sample prior to FISH. Since telomeres localize preferentially to the nuclear periphery (3,17), we hypothesized that P1- and P2-FISH would result in differences in telomere distribution. We measured the distance from center of the nucleus to telomere spots (figure 3A) by first delimiting the nuclear diameter and then fitting a circle to it. The distance of the telomere cluster to the center of nucleus was measured considering the radius value as the maximal distance from the center to nuclear periphery. As expected, radius value of P1-FISH nuclei was almost two times higher (average value of $1.09 \mu\text{m} \pm 0.18$) than radius of P2-FISH nuclei (average value of $0.65 \mu\text{m} \pm 0.07$). A relative radial position was determined for each telomeric cluster and classified according to three concentric nuclear zones of equal surfaces (figure 3B). When the distribution of hundreds of clusters was analyzed for both P1- and P2-FISH nuclei, a differential distribution was found between both cases: while clusters are distributed throughout the nucleus in both cases, in P1- nuclei they tend to localize more centrally, while they are mostly peripheral in P2-FISH nuclei. These data indicate that telomeric clusters tend to localize to the nuclear periphery but changes in nuclear structure, which occur to higher degrees in P1-FISH, may cause telomeric clusters to translocate to more central areas.

P2-FISH results in higher colocalization indexes for Rep20 and telomere signals

The difference observed in telomeric cluster distribution between both protocols prompted us to measure the effect of different preparations on colocalization indexes of telomere and Rep20 probes. Telomere and Rep20 tracts are located 10-12 kb apart (16), and given the heterochromatic, condensed nature of telomeric and subtelomeric regions (4), they are expected to colocalize. We imaged the P1- and P2-FISH nuclei hybridized with both probes and scored the number of telomeric and Rep20 spots both individually and in colocalization (figure 4 and table 1). Similar to the data obtained from confocal series and automated detection of telomeric clusters (figure 2C), a higher number of telomeric spots was scored for P1- (7.6 ± 2.3) than for P2-FISH nuclei (6.1 ± 1.5), but for Rep20 a smaller average was found in P1- (4.5 ± 1.5) compared to P2-FISH nuclei (6.1 ± 1.5). Thus, different numbers of chromosome end clusters are detected using P1-FISH depending on the probe used, while using P2-FISH, signals for Rep20 and telomere probes are detected at similar rates.

Non-colocalization, partial-colocalization and total-colocalization between both probes were analyzed (Table 1). The results showed a manifestly high frequency of total colocalization between Rep20 and telomere probes when FISH was performed with P2 (65%) compared to only 26.5% obtained with P1. Maximum value of partial-colocalization was observed in P1- (43.5%), while P2-FISH had lower partial colocalization index (13%). P1-FISH also

resulted in higher non-colocalization index when compared to P2-FISH: in P1- , 30% of Rep 20 spots did not colocalize with a telomeric spot, while the same index was 21% for P2-FISH. Overall, these data show that parasites fixed in suspension for long periods at low temperatures have their nuclear structure and compartmentalization, as well as the higher-order chromatin organization, much more preserved after the FISH procedure than parasites that are submitted to air-drying prior to a fast fixation at room temperature.

Discussion

The difficulties associated with genetic modification in *P. falciparum*, such as low transfection efficiency and limited selectable markers [reviewed by (26)] have hindered the manipulation of genomic loci for visualization of gene activity in living parasite cells. In the last 10 years, FISH has become the technique of choice for visualization of gene loci dynamics and chromatin domains in *P. falciparum*.

In this study we present evidence supporting the use of a new protocol for FISH in *P. falciparum*. FISH is a technique that requires the use of high-temperatures for chromatin denaturation. We found that nuclear fixation at low temperature in suspension for prolonged periods, combined with total avoidance of drying the preparation, leads to better conservation of the nuclear shape and volume. We named this new protocol 2 (P2), opposed to the more reported FISH protocol 1 [P1, (3)].

The improved conservation of nuclear architecture obtained when P2-FISH is employed was demonstrated by quantitative analysis of nuclear shape and volume. Automated analysis showed that nuclei submitted to P1-FISH are more deformed and have larger and more variable volume measures than nuclei submitted to P2-FISH. The observed increase in nuclear deformation and volume could be at least partially explained by the dehydration step in P1-FISH when iRBC are deposited on the slide and air-dried, prior to fixation and FISH development. In human cells, for instance, fixation/dehydration by methanol/acetic acid leads to flattening of nucleus and an enlarged nuclear surface (24). Although we did not observe flattening, our findings of increased nuclear surface/volume are in accordance with these results. On the other hand, P2-FISH nuclei were maintained in buffered suspension and dehydration was carefully avoided throughout the whole procedure, thus the nuclei retained a more regular morphology and decreased variation in shape and volume indicating an improved preservation of nuclear structure. Moreover, P2-FISH showed similar average volume measurements to parasites that were fixed in suspension at low temperatures but did not undergo denaturation/hybridization/washes procedures of FISH (data not show). This last result suggested that the nuclear shape and volume changes observed between P1- and P2-FISH could also be associated to the fixation time. In human cells, the type of fixation is essential for the maintenance of chromatin organization during DNA denaturation and paraformaldehyde is the fixative of choice for obtaining optimal compromise between 3D nuclear preservation and accessibility of DNA probes to the target (27,28). We performed fixation at room temperature in a short time (15 min) for P1- against lower temperature for a longer period (4°C, ~ 16 h) for P2-FISH. We speculated that combining low temperature with long fixation times would lead to improved shape conservation of the *P. falciparum* nucleus during FISH. Our results are supported by observations previously described (29). The authors reported that rat adenohypophysis cells fixed for two hours in glutaraldehyde showed better preservation of nuclei in their spherical form when compared to nuclei incubated in the same fixative solution for 15 min. Recently, an improved FISH protocol has been suggested by Mancio-Silva *et al.* (21). Although we incorporated the suggested saponin lysing step and fixation in solution in our P2-FISH preparations, we observed that longer

fixation periods resulted in even better conservation of nuclear structure, when compared to shorter fixation times (data not shown). Importantly, longer periods of fixation (more than 2 days) should be avoided since it can cause shrinkage of nuclei (our unpublished observations). Recent data (30) suggested that “explosion” of chromatin could be provoked due to the thermal shock when human granulocyte nucleus is fixed with cold methanol (- 20°C) followed by PBS wash at room temperature. These results indicate the need to keep temperatures constant and avoid thermal shocks when performing FISH, as is the case for P2.

A significant difference in the number of telomeric clusters was observed between P1- and P2-FISH nuclei when clusters were automatically detected (figure 2C). Chromosome end clusters are structures stabilized by proteins, and the treatment of nuclei with mild detergents prior to fixation led to a small increment in the number of clusters detected after FISH, suggesting that membrane integrity is important for maintaining chromosome end association, and that even mild treatments may cause disruption of clusters (11). We hypothesize that the combined drying step with shorter fixation for P1-FISH leads to destabilization of clusters and the nuclear membrane when nuclei are submitted to high-temperatures for DNA denaturation.

P. falciparum chromosome end clusters preferentially localize to the nuclear periphery (17). However, at least in our hands a great variation of nuclear distribution of the clusters was observed among different experiments with P1-FISH preparations. We found that, when several randomly chosen P1-FISH nuclei are scored for telomeric cluster distribution, most sites tend to localize to central areas, while in P2-FISH sites are more concentrated in the nuclear periphery. This differential distribution between P1- and P2-FISH can be explained by alterations in the nuclear architecture and higher-order chromatin structure caused by the P1-FISH dehydration step, as mentioned above. When several randomly chosen nuclei are scored for telomeric cluster positioning, the translocation of clusters to nuclear central areas caused by P1-FISH becomes evident.

The same kind of alterations could also explain why P1-FISH nuclei had a lower telomere-Rep20 colocalization index, as well as a higher partial colocalization index and a different average number of telomeric (7.6) and Rep20 (4.5) signals than P2-FISH nuclei, which had higher total colocalization indexes and the same average number of telomeric (6.1) and Rep20 signals (5.9). Since parasites used in both protocols are always from the same population, the higher partial/non-colocalization indexes and the differential number of chromosome end clusters detected depending on the type of probe observed in P1-FISH nuclei should be attributed to changes in nuclear and chromatin structure rather than chromosome truncation (17). As mentioned above, fixation and dehydration of human leukocytes by methanol/acetic acid leads to nuclear surface enlargement (24). The authors also reported that perinuclear centromeric chromatin is shifted towards the nuclear membrane in this type of preparation, meaning that the absolute distance between centromeres and nuclear membrane did not change, when compared to the absolute distance measured in paraformaldehyde fixed samples (hydrated). However, euchromatin located in central nuclear areas was not proportionally shifted toward the nuclear periphery, resulting in larger distances from the nuclear membranes in dehydrated preparations when compared to hydrated

ones. Thus, different chromatin domains respond differently to the dehydration process, resulting in changes of relative chromosomal/loci positions. We hypothesize that in *P. falciparum*, dehydration of the nucleus may lead to distortion of the chromatin structure, causing changes in the relative positions of telomeres and Rep20 tracts in relation to each other as well as in relation to the nuclear membrane. Hence, dehydration steps in FISH should be avoided when relative DNA loci positions and nuclear architecture are to be considered.

The nuclear positioning of active *var* genes regarding the chromosome end clusters has been a matter of controversy [reviewed by (2)]. In the light of our findings, it is advisable to interpret results carefully when it comes to nuclear positioning using protocols that involve air-drying and short fixations. Several years of research on FISH optimization have allowed the standardization of a 3D-FISH protocol for mammalian cells (25,28). Although other parameters such as denaturation temperature and time should be tested in order to evaluate their effect on *P. falciparum* nuclear structure, we believe this study is an important step taken toward the development of a 3D-FISH protocol for *P. falciparum* and will have implications on DNA-FISH as well as derived techniques applied to the study of the nuclear biology of malaria parasites.

Funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [03/12997-8] (Brazil); Ministry of Education, Science and Technology (MEST); the Gyeonggi government; and the Korean Institute of Science and Technology Information (S. Korea).

Acknowledgements

We would like to thank Prof. Peter Preiser for originally providing us with 3D7 strain; Prof. Artur Scherf and Prof. Marta Ponzi for kindly providing cloned Rep20 and telomere, respectively; Prof. José Franco da Silveira for his support; F. M. Dossin, J. L. Siqueira-Neto and M. Giardini for critical comments; and L. Pirrit for revising the manuscript.

References

1. Volpi, E.V. and Bridger, J.M. (2008) FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *BioTechniques*, 45, 385-409.
2. Scherf, A., Lopez-Rubio, J.J. and Riviere, L. (2008) Antigenic Variation in *Plasmodium falciparum*. *Annual Review of Microbiology*, 62, 445-470.
3. Freitas-Junior, L.H., Bottius, E., Pirrit, L.A., Deitsch, K.W., Scheidig, C., Guinet, F., Nehrbass, U., Wellems, T.E. and Scherf, A. (2000) Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 407, 1018.
4. Freitas-Junior, L.H., Hernandez-Rivas, R., Ralph, S.A., Montiel-Condado, D., Ruvalcaba-Salazar, O.K., Rojas-Meza, A.P., Mancio-Silva, L., Leal-Silvestre, R.J., Gontijo, A.M., Shorte, S. *et al.* (2005) Telomeric Heterochromatin Propagation and Histone Acetylation Control Mutually Exclusive Expression of Antigenic Variation Genes in Malaria Parasites. *Cell*, 121, 25-36.
5. Mancio-Silva, L., Rojas-Meza, A.P., Vargas, M., Scherf, A. and Hernandez-Rivas, R. (2008) Differential association of Orc1 and Sir2 proteins to telomeric domains in *Plasmodium falciparum*. *J Cell Sci*, 121, 2046-2053.
6. Flueck, C., Bartfai, R., Volz, J., Niederwieser, I., Salcedo-Amaya, A.M., Alako, B.T.F., Ehlgren, F., Ralph, S.A., Cowman, A.F., Bozdech, Z. *et al.* (2009) *Plasmodium falciparum* Heterochromatin Protein 1 Marks Genomic Loci Linked to Phenotypic Variation of Exported Virulence Factors. *PLoS Pathog*, 5, e1000569.
7. Li, F., Sonbuchner, L., Kyes, S.A., Epp, C. and Deitsch, K.W. (2008) Nuclear non-coding RNAs are transcribed from the centromeres of *Plasmodium falciparum* and are associated with centromeric chromatin. *J. Biol. Chem.*, 283, 5692-5698.
8. Ralph, S.A., Scheidig-Benatar, C. and Scherf, A. (2005) Antigenic variation in *Plasmodium falciparum* is associated with movement of var loci between subnuclear locations. *Proc Natl Acad Sci*, 102, 5414-5419.
9. Duraisingh, M.T., Voss, T.S., Marty, A.J., Duffy, M.F., Good, R.T., Thompson, J.K., Freitas-Junior, L.H., A., S., Crabb, B.S. and Cowman, A.F. (2005) Heterochromatin silencing and locus repositioning linked to regulation of virulence genes in *Plasmodium falciparum*. *Cell*, 121, 13-24.
10. Voss, T.S., Healer, J., Marty, A.J., Duffy, M.F., Thompson, J.K., Beeson, J.G., Reeder, J.C., Crabb, B.S. and Cowman, A.F. (2006) A var gene promoter controls allelic exclusion of virulence genes in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 439, 1004-1008.
11. Marty, A.J., Thompson, J.K., Duffy, M.F., Voss, T.S., Cowman, A.F. and Crabb, B.S. (2006) Evidence that *Plasmodium falciparum* chromosome end clusters are cross-linked by protein and are the sites of both virulence gene silencing and activation. *Molecular Microbiology*, 62, 72-83.

12. Dzikowski, R., Li, F., Amulic, B., Eisberg, A., Frank, M., Patel, S., Wellems, T.E. and Deitsch, K.W. (2007) Mechanisms underlying mutually exclusive expression of virulence genes by malaria parasites. *EMBO reports*, 8, 959–965.
13. Mok, B.W., Ribacke, U., Rasti, N., Kironde, F., Chen, Q., Nilsson, P. and Wahlgren, M. (2008) Default Pathway of *var2csa* Switching and Translational Repression in *Plasmodium falciparum*. *PLoS ONE*, 3, e1982.
14. Lopez-Rubio, J.-J., Mancio-Silva, L. and Scherf, A. (2009) Genome-wide analysis of heterochromatin associates clonally variant gene regulation with perinuclear repressive centers in Malaria parasites. *Cell Host Microbe*, 5, 179.
15. Howitt, C.A., Wilinski, D., Llinas, M., Templeton, T.J., Dzikowski, R. and Deitsch, K.W. (2009) Clonally variant gene families in *Plasmodium falciparum* share a common activation factor. *Molecular Microbiology*, 73, 1171-1185.
16. Figueiredo, L.M., Pirrit, L.A. and Scherf, A. (2000) Genomic organisation and chromatin structure of *Plasmodium falciparum* chromosome ends. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 106, 169-174.
17. Figueiredo, L.M., Freitas-Junior, L.H., Bottius, E., Olivo-Marin, J.-C. and Scherf, A. (2002) A central role for *Plasmodium falciparum* subtelomeric regions in spatial positioning and telomere length regulation. *EMBO J*, 21, 815.
18. Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S. *et al.* (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419, 498.
19. Oquendo, P., Goman, M., Mackay, M., Langsley, G., Walliker, D. and Scaife, J. (1986) Characterisation of a repetitive DNA sequence from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 18, 89-101.
20. Trager, W. and Jensen, J.B. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193, 673-675.
21. Mancio-Silva, L., Freitas-Junior, L.H. and Scherf, A. (2008) In Moll, K., Ljungström, I., Perlmann, H., Scherf, A. and Wahlgren, M. (eds.), *Methods in Malaria Research*, Manassas, Virginia and Paris, France, Vol. 5th edition, pp. 223-224.
22. Dossin, F.d.M., Dufour, A., Dusch, E., Siqueira-Neto, J., Moraes, C.B., Yang, G.S., Cano, M.I., Genovesio, A. and Freitas-Junior, L.H. (2008) Automated Nuclear Analysis of *Leishmania major* Telomeric Clusters Reveals Changes in Their Organization during the Parasite's Life Cycle. *PLoS ONE*, 3, e2313.
23. Mongelard, F., Vourc'h, C., Robert-Nicoud, M. and Usson, Y. (1999) Quantitative assessment of the alteration of chromatin during the course of FISH procedures. *Cytometry*, 36, 96-101.
24. Kozubek, S., Lukasova, E., Amrichova, J., Kozubek, M., Liskova, A. and Slotova, J. (2000) Influence of Cell Fixation on Chromatin Topography. *Analytical Biochemistry*, 282, 29.

25. Solovei, I., Cavallob, A., Schermelleha, L., Jauninc, F., Scasselatic, C., Cmarkoc, D., Cremerb, C., Fakanc, S. and Cremera, T. (2002) Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during Three-Dimensional Fluorescence *in situ* Hybridization (3D-FISH). *Experimental Cell Research*, 276, 10-23.
26. Balu, B. and Adams, J.H. (2007) Advancements in transfection technologies for *Plasmodium*. *International Journal for Parasitology*, 37, 1.
27. Hendzel, M.J. and Bazett-Jones, D.P. (1997) Fixation-dependent organization of core histones following DNA fluorescent in situ hybridization. *Chromosoma*, 106, 114-123.
28. Cremer, M., Grasser, F., Lanctôt, C., Müller, S., Neusser, M., Zinner, R., Solovei, I. and Cremer, T. (2008), *The Nucleus*, pp. 205.
29. Eneström, S. and Kniola, B. (1992) Short fixation-shock freezing and freeze-drying versus chemical fixation and dehydration: computer assisted image analysis of morphological variables and immunogold labeling density on pituitary secretory granules. *Biotech. Histochem.*, 67, 268-287.
30. Olins, A.L., Monika Zwerger, M., Herrmann, H., Zentgraf, H., Simon, A.J., Monestier, M. and Olinsa, D.E. (2008) The human granulocyte nucleus: unusual nuclear envelope and heterochromatin composition. *Eur J Cell Biol.*, 87, 279-290.

Table 1. Quantification of the average number of signals per nucleus and percentages of colocalization of P1- and P2-FISH hybridized with telomere and Rep20 probes. NC, non-colocalization; PC, partial colocalization; TC, total colocalization (as shown in figure 4).

	<i>n</i>	Number of spots		Frequency of colocalization (%)		
		Telomere	Rep20	NC	PC	TC
P1-FISH	196	7.6 ± 2.3	4.5 ± 1.5	30	43.5	26.5
P2-FISH	280	6.1 ± 1.5	5.9 ± 1.9	22	13	65

Figures legends

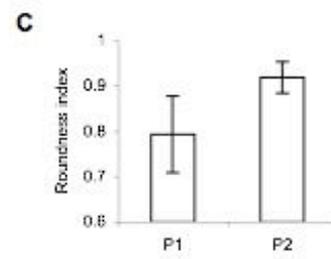
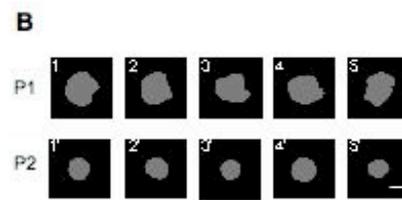
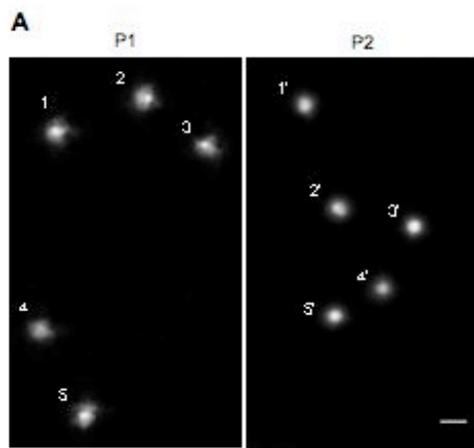
Figure 1. Dehydrated, briefly-fixed nuclei are deformed after FISH when compared to hydrated, long-fixed nuclei. (A) Examples of nuclei scored for roundness for P1- and P2-FISH. Observe that P1-FISH nuclei have a more irregular contour. Bar, 2 μ m. **(B)** Nuclei shown on (A) were automatically segmented for roundness measurement. Nuclei 1~5 and 1'-5' depict segmentation of the correspondent nuclei in (A) for P1- and P2-FISH, respectively. Bar, 1 μ m. **(C)** Roundness index measurement for P1- ($n = 146$) and P2-FISH ($n = 190$) nuclei.

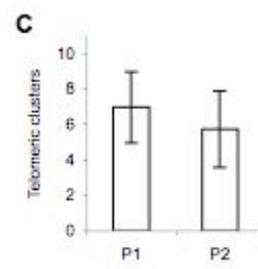
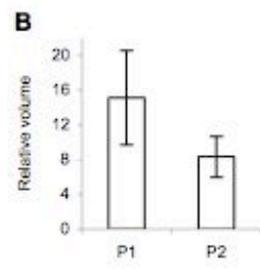
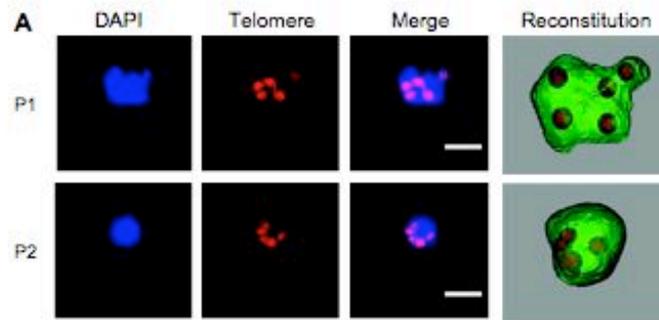
Figure 2. Nuclei submitted to P1-FISH show enlarged, more variable nuclear volume and higher number of telomeric clusters. (A) Examples of representative 2D projections and reconstitutions of confocal images of parasites submitted to P1- and P2-FISH using a telomeric probe for the detection of chromosome ends clusters (in red). Nuclei were stained with DAPI (blue). Bars, 1 μ m. Automated quantification of the relative volume **(B)** and the average number of telomeric clusters **(C)** of parasites submitted to either P1- ($n = 32$) or P2-FISH ($n = 33$) as shown in (A), using a customized algorithm to analyze confocal Z-series. Vertical bars correspond to samples standard deviations.

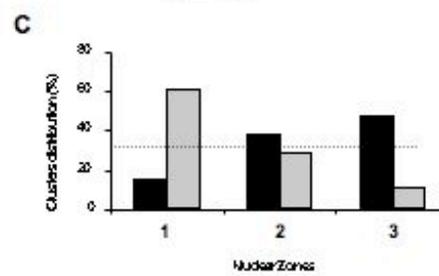
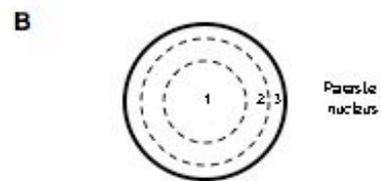
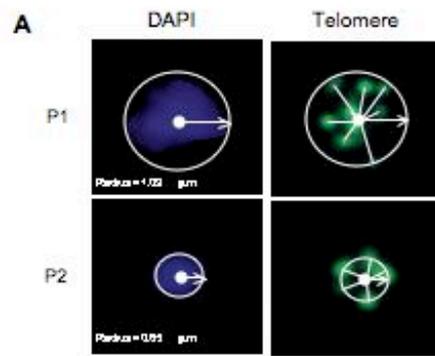
Figure 3. P1-FISH causes the redistribution of telomeric clusters to central nuclear areas. (A) Schematic representation of P1- and P2-FISH nuclei surface and distance of chromosome end clusters (detected by telomeric probes) to the nuclear center. A line was manually outlined around nuclei (stained with DAPI, right) from P1- and P2-FISH. The best-fitting circle was automatically determined for each nucleus and the radius was computed. The center of each cluster was manually determined and the absolute distance of the cluster to the nucleus center was automatically calculated and normalized to the population average nuclear radius. **(B)** Telomeric cluster position scored as shown in (A) and classified according to the represented nuclear concentric zones 1, 2 and 3 of equal surfaces. **(C)** Distribution of telomeric clusters from P1- (gray bars, $n = 50$) and P2-FISH nuclei (black

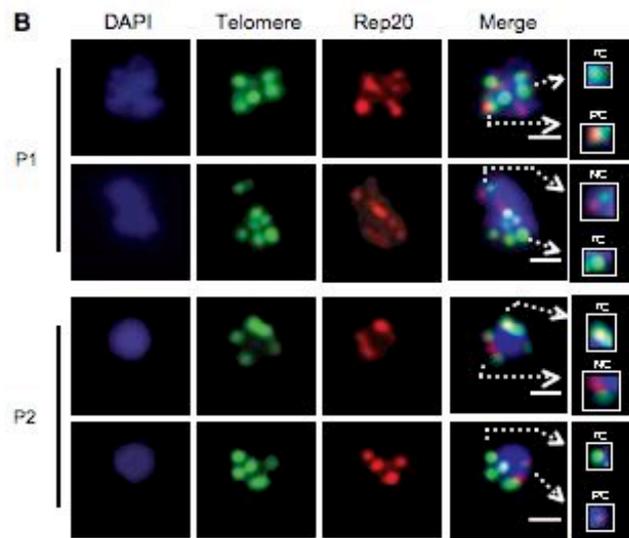
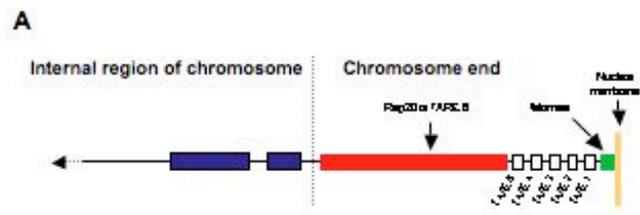
bars, $n = 50$) among zones 1 (central), 2 (intermediate) and 3 (peripheric). The horizontal line is set at 33.3% to indicate the limit for random distribution for each zone.

Figure 4. Two-color FISH for telomere and Rep20 show that P2-FISH leads to improved colocalization indexes. (A) Schematic representation of a hypothetical chromosome end showing the location of Rep20 and telomere tracts on a *P. falciparum* chromosome arm tethered to the nuclear membrane. The sizes and positions of TARES 1-6 and telomere repeat are in scale. **(B)** Examples of FISH images of P1- (upper rows) and P2-FISH (bottom rows) of DAPI-stained nuclei (blue) hybridized with telomere (green) and Rep20 (red) probes and scored for colocalization (table 1). Islets (far right) show examples of non-colocalization (NC), partial colocalization (PC) and total colocalization (TC) between both probes. Bar, 1 μ m.









In situ visualization of *Plasmodium falciparum* RNA synthesis sites

Carolina B. Moraes¹, Fernando M. Dossin², Min-Je Ku¹, Lucio H. Freitas-Junior^{1*}

¹Malaria Research, Institut Pasteur Korea, Seoul, South Korea

²Dept. de Micro, Imuno e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, Sao Paulo, Brazil

In order to accomplish antigenic variation, *Plasmodium falciparum* must have *var* gene transcription strictly regulated. In recent years it has become clear that this regulation involves epigenetic mechanisms and is related to the higher-order chromatin structure. It is already known that the transcriptional status of subtelomeric *var* genes is related to distinct levels of histone acetylation at their promoters (Freitas-Junior et al. 2005, Cell 121, 125-36). However, *var* gene transcription is still poorly understood. For instance, the type of RNA polymerase responsible for transcribing them is still unknown. Nor do we know how *var* gene transcription can occur at the nuclear periphery, since this region is essentially composed of heterochromatin. The current data suggest there could be a special peripheral compartment for transcription, but a transcription factory or any type of specialized sub nuclear structure where transcription of *var* genes could occur remains to be demonstrated. A specialized sub nuclear structure has, however, been shown in *Trypanosoma brucei* (Navarro and Gull, 2001, Nature 414, 759-63). By combining BrUTP incorporation with other techniques, the authors showed the active *VSG* gene is transcribed in a special extranucleolar compartment containing RNA polymerase I (pol I). In this work they also showed that the inactive *VSG* genes are excluded from this special compartment, and that this structure, then called transcriptional body, is conserved even in the absence of DNA. To help understand *var* gene transcription and answer other important questions in *Plasmodium* biology, we developed the BrUTP Incorporation technique for *P. falciparum*.

*Corresponding author: junior@pasteur.or.kr

Visualizing transcription sites in *P. falciparum* nucleus

In asexual blood stage forms of the parasite, nascent RNAs can be assessed by immunofluorescence visualization after *in situ* BrUTP incorporation. Figure 1 shows a *Plasmodium falciparum* nucleus after BrUTP labeling and immunodetection. Although the whole nucleus is labeled, it is possible to visualize some brighter dots over the background.

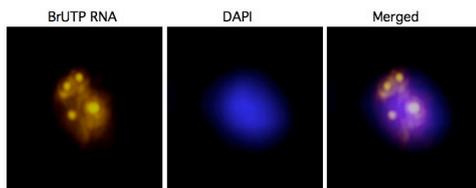


Figure 1 *In situ* Br-UTP labeling of nascent RNA in *P. falciparum* (ring stage). After incorporation of BrUTP, nascent RNA was visualized by immunofluorescence using a monoclonal antibody against BrdU.

The labeling pattern of BrUTP in *P. falciparum* somewhat resembles *T. brucei* whole nuclear labeling. However, when pre-treated with α -amanitin, bloodstream trypanosomes have 2 pol I-rich transcription foci. One of them is the nucleolus, and the other is a transcriptional body where the *VSG* gene is most probably transcribed (see the representative drawing in fig. 2).

The current model for activation of *var* genes states that a subtelomeric *var* gene must leave a cluster of inactive *var* genes and be translocated to an euchromatin region in order to be activated (Ralph et al., 2005, PNAS 102, 5414-9).

Co-relation between chromatin modifications and transcriptional sites

Chromatin modifications are related to transcription status of genes in many organisms. Recently, Freitas-Junior and colleagues showed that acetylation of histones H3 and H4 is related to *var* gene activation. Moreover, this work suggests histone acetylation also plays a role in regulation of other genes in blood stage parasites.

In this context, BrUTP Incorporation could help to explain how epigenetics factors and transcriptional sites are organized in the nucleus of the parasite. Actually, acetylated histones H3 and H4 are heterogeneously distributed along *P. falciparum* nucleus (fig. 3), suggesting that there may be discrete compartmentalization of transcription sites in *P. falciparum* nucleus.

Perspectives

We believe the BrUTP Incorporation technique will help to answer some very important questions in *P. falciparum* biology. For this purpose, our next experiments will consist of:

1. Inhibition studies using α -amanitin will indicate if *P. falciparum* has an extra pol I transcriptional compartment.
2. Combining BrUTP incorporation and IF with different antibodies will allow the visualization of the co-relation of chromatin modifications (acetylation), and transcriptional sites.
3. The 3-D location of *P. falciparum* transcriptional sites can be assessed using new technology that allows the visualization of parasite nuclei in solution, without a prior air-drying step (which damages the native conformation of the nuclei).

Based on *T. brucei* and other models, one could hypothesize that there is a special "RNA factory" for transcription of *var* genes in *P. falciparum* (fig. 2).

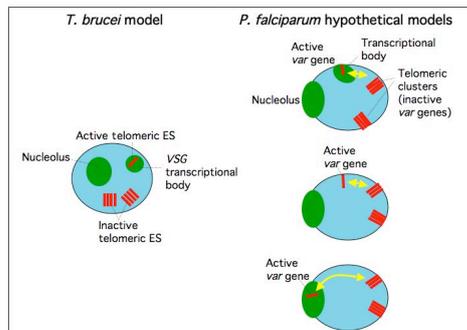


Figure 2 Working hypothesis for *P. falciparum* *var* gene regulation. Left side: in *T. brucei* nucleus, the active expression site (ES) is located in a special pol I-rich transcription body, from where the inactive ESs are excluded. Right side: working models for *P. falciparum* *var* transcription. In the top model, the active subtelomeric *var* gene leaves the telomeric cluster in order to be transcribed in a special transcription compartment. In the middle model, the *var* gene also leaves the telomeric cluster to be transcribed at the nuclear periphery, but in this case transcription does not occur in a special compartment. In the bottom model, the active *var* gene is translocated from the telomeric cluster to the nucleolus, where it is transcribed.

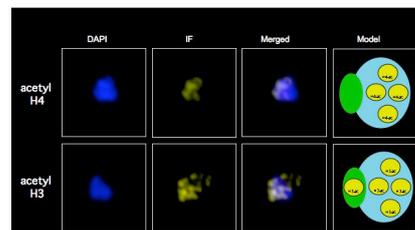


Figure 3 Distribution of acetylated histones H3 and H4 in *P. falciparum* nucleus. The histone variants were visualized after immunofluorescence (IF) using polyclonal antibodies reactive to acetylated residues of the respective histones. The model shows the distribution of acetylated forms in the nucleus.

Plasmodium falciparum transcription sites in the context of nuclear architecture

Carolina B. Moraes¹, Fernando M. Dossin¹, Auguste Genovesio², Malte Wachsmuth³, Min-Je Ku¹ and Lucio Freitas-Junior^{1*}

¹Systems Biology of Pathogens, ²Image Mining and ³Cell Biophysics, Institut Pasteur Korea, Seoul, South Korea

In the spite of recent years advances on our knowledge about gene expression patterns in *Plasmodium falciparum*, specially regarding var genes, little is known about the general molecular regulators of gene expression.

Microarray data show that during the erythrocytic cycle of *P. falciparum* genes are transcribed in a temporal pattern, with functionally correlated genes transcribed together (Bozdech et al., 2003, Le Roch et al., 2003). *P. falciparum* transcription is thought to be monocistronic, and there is no correlation between linear chromosomal organization of genes and temporal pattern of activation. The current data also point to epigenetic regulation of gene expression: developmentally regulated genes are acetylated at histone H4 during the erythrocytic cycle, and this pattern of acetylation is excluded from the nuclear periphery, a region associated with the histone deacetylase PfSir2 (Freitas-Junior et al., 2005, Duraisingh et al., 2005). This data point to a functional compartmentalization of *P. falciparum* nucleus.

Works on other systems show the importance of nuclear compartmentalization in gene regulation. In this context, dissecting transcription spatial organization is the first step for a deeper understand of nuclear architecture importance in *P. falciparum* gene regulation.

With this aim, we were able to adapt a technique that allows visualization of transcription sites in *Plasmodium falciparum* by incorporation of bromo-triphosphate-uridine (Br-UTP) into nascent RNA and subsequent visualization of newly synthesized transcripts by immunofluorescence. Here we show our experimental efforts to unravel transcription dynamics and the perspectives of our work.

*Corresponding author: junior@pasteur.or.kr

Transcription sites in *P. falciparum*

In asexual blood stage forms of the parasite, nascent RNAs can be assessed by immunofluorescence visualization after *in situ* BrUTP incorporation. Figure 1 shows a *Plasmodium falciparum* nucleus after BrUTP labeling and immunodetection. Although the whole nucleus is labeled, it is possible to visualize some brighter spots, which are the transcription sites (figure 1A).

These data suggest that there are transcription sites on the nuclear periphery, a region composed of heterochromatin-like region and thought to be transcriptionally silent in *P. falciparum*. Confocal microscopy and image mining algorithms will be employed to determine the distribution of sites on different nuclear concentric regions (figure 1B).

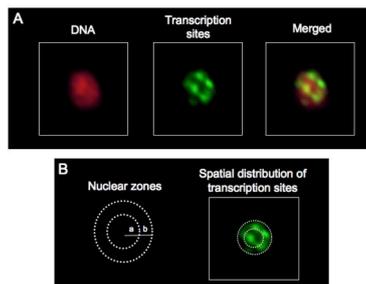


Figure 1. *In situ* Br-UTP labeling of nascent RNA in *P. falciparum* 3D7 (ring stage, 12 hpi). (A) After incorporation of BrUTP, nascent RNA was visualized by immunofluorescence using a monoclonal antibody against BrU. DNA, pseudocolored in red, was stained with DAPI. (B) Scheme showing how nuclei will be divided in concentric zones of equal volume (a, b) for the study of transcription sites spatial distribution.

Visualizing α -amanitin resistant transcription

Eukaryotes have three DNA-dependent RNA polymerases responsible for nuclear transcription, pol I, pol II and pol III. The toxin α -amanitin can specifically inhibit the RNA polymerases depending on its concentration. At 200 μ g/ml, α -amanitin inhibits pol II and pol III but not pol I. Therefore we employed this concentration of α -amanitin in our experiments to visualize pol I transcription sites. Our results (figure 2) show that the majority of cells possess a single α -amanitin resistant transcription site. Less frequently, we can observe some cells with two α -amanitin resistant sites (~40%). These are preliminary data, and extensive experiments should be performed using a nucleolar marker, such as an anti-fibrillarin antibody, in order to clarify the significance of the second pol I transcription site.

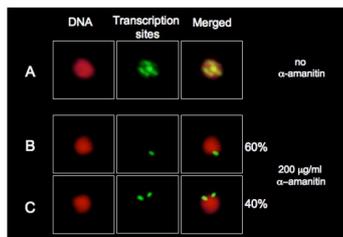


Figure 2. α -Amanitin resistant transcription sites. *P. falciparum* 3D7 (24 hpi) nascent RNA was labeled by BrUTP and visualized by immunofluorescence. The transcription sites visualized in A comprises transcription by pol I, pol II and pol III. At 200 μ g/ml (B and C) the inhibitor α -amanitin prevents transcription by pol II and pol III, and thus only pol I transcription sites are labeled. Most frequently, *P. falciparum* nuclei display a single α -amanitin resistant transcription site (B), but some of the cells display two sites (C).

Hypothesis on transcription architecture in *P. falciparum*

Even though there is not accurate information yet on the number of transcription sites, the data shown here point to a smaller number of sites than expected from the number of transcribed genes (Bozdech et al., 2003, Le Roch et al., 2003). The clustering of genes on transcription sites has been already demonstrated for mammalian cells (reviewed by Jackson DA, 2003). Therefore, we propose two preliminary model for transcription sites organization in *Plasmodium falciparum* (figure 3). Future experiments employing FISH will further clarify this question.

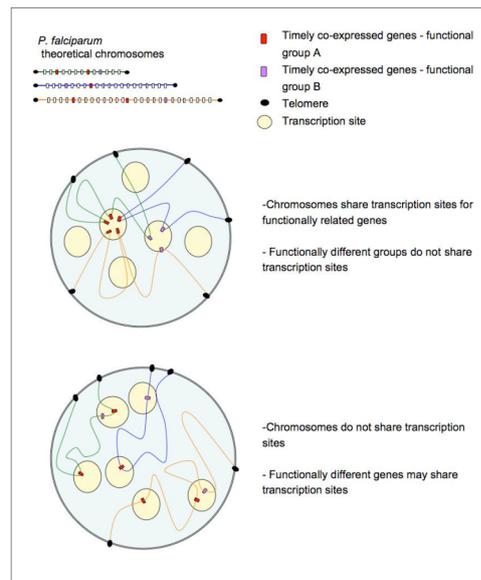


Figure 3. Working hypothesis for *P. falciparum* transcription organization. White squares represent non-active genes; red and lilac squares represent two different functional groups of co-expressed genes. The first model shows that functionally related genes on the different chromosomes share exclusive transcription sites; on the second model, chromosomes reside on "territories", to which transcription is confined, and functionally unrelated genes can share transcription sites as long as belong to the same chromosome, and therefore reside on the same "territory".

Perspectives

Summing up and expanding what has been proposed above, these are the next steps in our attempts to a deeper understand of how nuclear architecture influences gene expression in *Plasmodium falciparum*:

- use of a nucleolar marker for elucidating the nature of the second α -amanitin resistant site;
- perform the 3-D modeling of *P. falciparum* transcriptional sites dynamics by confocal microscopy and image mining along the erythrocytic life cycle, including gametocytogenesis;
- investigate the correlation between transcription sites and higher-order of chromatin, such as correlation between transcription sites and histone acetylation or heterochromatin/euchromatin regions;
- carry out FISH experiments for accessing the distribution of functionally related genes accordingly to the transcriptional state.

Spatial organization of transcription as a potential gene regulation mechanism in *Plasmodium falciparum*

Carolina B. Moraes^{1,3}, Elodie Dusch², Alexandre Dufour², Fernando M. Dossin¹, Auguste Genovesio² and Lucio Freitas-Junior^{1*}

¹Systems Biology of Pathogens and ²Image Mining Group, Institut Pasteur Korea, South Korea; ³DMIP - Universidade Federal de São Paulo, Brazil
Correspondence: cbmoraes@ip-korea.org, junior@ip-korea.org

Growing evidence points that transcription spatial organization is an important epigenetic factor for gene regulation in eukaryotes. In mammalian cells, genes are transcribed in discrete nuclear structures known as transcription sites, and developmentally co-regulated, functionally related genes have been shown to share transcription sites. During its erythrocytic cycle, *Plasmodium falciparum* shows a remarkably complex pattern of gene expression, paradoxically contrasting with the low number of putative transcription factors encoded by its genome. Therefore, it has been proposed epigenetics mechanisms could account for gene regulation in *P. falciparum*; indeed, the importance of epigenetics has been demonstrated for *var* genes. Given that during the erythrocytic cycle most of functionally related genes are co-expressed and cell cycle (developmentally) regulated, it is reasonable to investigate whether epigenetic factors such as transcription organization play a role in expression of such genes. To this aim, we have labeled the transcription sites with BrUTP in *P. falciparum* erythrocytic forms. Here we summarize our findings up to date.

Transcription is spatially organized in *P. falciparum* nucleus and resembles the pattern found in vertebrate cells

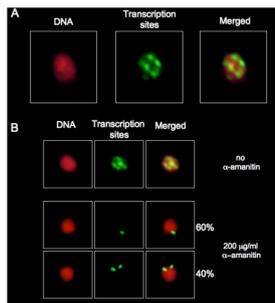


Figure 1. In situ Br-UTP labeling of nascent RNA in *P. falciparum* 3D7. (A) After incorporation of Br-UTP, nascent RNA was visualized by immunofluorescence using a monoclonal antibody against BrdU. DNA, pseudocolored in red, was stained with DAPI. (B) α -Amanitin resistant transcription sites. Nascent RNA was labeled by Br-UTP and visualized by immunofluorescence. At 200 μ g/ml, the inhibitor α -amanitin prevents transcription by pol II and pol III, and thus only pol I transcription sites are labeled. Most frequently, *P. falciparum* nuclei display a single α -amanitin resistant transcription site (middle row), but some of the cells display two sites (lower row).

Cell type	Nuclear area (μm^2)	Transcription sites number	Transcription Sites density (number/ μm^2)
Ring (8-12 hpi)	2.9 \pm 0.5	8 \pm 2	2.8
Tropho (20-24 hpi)	2.8 \pm 0.7	7 \pm 2	2.5
Vertebrate cells	N/A	Over 2800	1.0

Table 1. Quantitative analysis of transcription sites in *P. falciparum* 3D7 rings (8-12 hpi, n=18) and trophozoites (20-24 hpi, n=39). Numbers relate to manual quantification of transcription sites from maximum intensity 2D projection of 3D series. Average values are shown followed by standard deviation values. Values for vertebrate cells were reproduced from Franc-Trocard and Cook, 2006.

Are active genes clustered in *P. falciparum*?

Stage	Number of active genes	Av. number of sites	Av. number of genes/site
Ring (8-12 hpi)	561	8	70
Tropho (20-24 hpi)	359	7	51

Table 2. Evidence that *P. falciparum* active genes are clustered in "transcription factories". Number of active genes in each stage was retrieved from PlasmoDB using the "timing of expression" tool - microarray evidence for 3D7 with max. expression time 10 hours \pm 2 for rings and 22 hours \pm 2 for trophozoites.

Conclusions and perspectives

Our results show *P. falciparum* transcription is organized in a pattern that resembles the transcription architecture found in higher organisms, although the 2D site density observed in *P. falciparum* is more than the double of the documented number in vertebrate cells. Our data also points to the clustering of active genes in "transcription factories" in the malaria parasite. This is important because spatial clustering has been demonstrated to play a role in the regulation of developmentally regulated genes in higher organisms.

The following are the next steps in our attempts to have a deeper understanding of how nuclear architecture influences gene expression in *Plasmodium falciparum*:

- use of a nucleolar marker for elucidating the nature of the second α -amanitin resistant site;
- combine confocal and electron microscopy with automated image analysis to develop a 3D model of *P. falciparum* transcription architecture along the erythrocytic life cycle;
- investigate the correlation between number and intensity of transcription sites in the presence or absence of a histone deacetylase inhibitor, such as trichostatin A (TSA);
- purify, quantify and identify nascent BrRNA, and correlate the data with the number of transcription sites in order to determine if genes are clustered in *P. falciparum*;
- carry out DNA/RNA FISH experiments for accessing the distribution of functionally related genes accordingly to the transcriptional state;
- develop 3C (chromosome conformation capture) approach in order to better characterize long-range gene interactions in *P. falciparum*.

3D modeling of transcription architecture in *P. falciparum* by automated image analysis

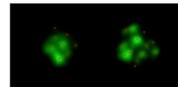


Figure 2. Example of automated identification and quantification of transcription sites in *P. falciparum*. Transcription sites are labeled by BrUTP (green) and the intensity gravity center is detected by a tailored algorithm (red). By this method, the average site number is 9, with ± 3 sites as standard deviation (n = 4). Data and pictures displayed refer to rings 8-12 hpi.

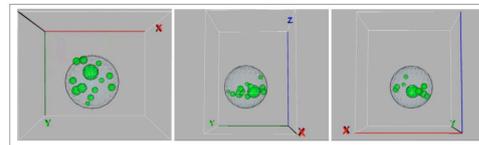


Figure 3. Three-dimensional views of a *P. falciparum* ring (8-12 hpi) nucleus showing the spatial distribution of transcription sites. Nucleus is represented by a blue mesh and transcription sites are in green. The nucleus was estimated as an 1 μm diameter sphere around the transcription dots. In this model, site sizes are proportional to their fluorescence intensity in 3D confocal series rather than their actual physical size in the pictures.

Hypothesis on transcription architecture in *P. falciparum*

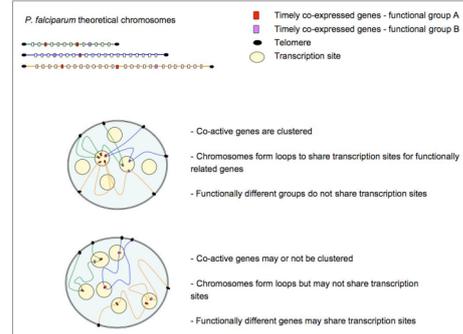


Figure 4. Working hypothesis for *P. falciparum* transcription organization. White squares represent non-active genes, red and black squares represent two different functional groups of co-expressed genes. The first model shows that functionally related genes on the different chromosomes share exclusive transcription sites, on the second model, chromosomes reside on "territories", to which transcription is confined, and functionally unrelated genes can share transcription sites as long as belong to the same chromosome, and therefore reside on the same "territory".

Automated Nuclear Analysis of *Leishmania major* Telomeric Clusters Reveals Changes in Their Organization during the Parasite's Life Cycle

Fernando de M. Dossin¹✉, Alexandre Dufour²✉, Elodie Dusch²✉, Jair L. Siqueira-Neto¹, Carolina B. Moraes^{1,3}, Gyong Seon Yang¹, Maria Isabel Cano⁴, Auguste Genovesio², Lucio H. Freitas-Junior^{1*}

1 Systems Biology of Pathogens Group, Institut Pasteur Korea, Seoul, South Korea, **2** Image Mining Group, Institut Pasteur Korea, Seoul, South Korea, **3** Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil, **4** Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil

Abstract

Parasite virulence genes are usually associated with telomeres. The clustering of the telomeres, together with their particular spatial distribution in the nucleus of human parasites such as *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma brucei*, has been suggested to play a role in facilitating ectopic recombination and in the emergence of new antigenic variants. *Leishmania* parasites, as well as other trypanosomes, have unusual gene expression characteristics, such as polycistronic and constitutive transcription of protein-coding genes. *Leishmania* subtelomeric regions are even more unique because unlike these regions in other trypanosomes they are devoid of virulence genes. Given these peculiarities of *Leishmania*, we sought to investigate how telomeres are organized in the nucleus of *Leishmania major* parasites at both the human and insect stages of their life cycle. We developed a new automated and precise method for identifying telomere position in the three-dimensional space of the nucleus, and we found that the telomeres are organized in clusters present in similar numbers in both the human and insect stages. While the number of clusters remained the same, their distribution differed between the two stages. The telomeric clusters were found more concentrated near the center of the nucleus in the human stage than in the insect stage suggesting reorganization during the parasite's differentiation process between the two hosts. These data provide the first 3D analysis of *Leishmania* telomere organization. The possible biological implications of these findings are discussed.

Citation: Dossin FM, Dufour A, Dusch E, Siqueira-Neto JL, Moraes CB, et al. (2008) Automated Nuclear Analysis of *Leishmania major* Telomeric Clusters Reveals Changes in Their Organization during the Parasite's Life Cycle. PLoS ONE 3(6): e2313. doi:10.1371/journal.pone.0002313

Editor: Matthew Baylis, University of Liverpool, United Kingdom

Received: March 9, 2008; **Accepted:** April 20, 2008; **Published:** June 11, 2008

Copyright: © 2008 Dossin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by Institut Pasteur Korea.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: junior@ip-korea.org

✉ Current address: Quantitative Image Analysis, Institut Pasteur, Paris, France.

✉ These authors contributed equally to this work.

Introduction

The study of nuclear organization is essential to understanding the way genomes function. Spatial localization of a gene within the nucleus can modulate its expression, leading either to its activation or repression [1]. Chromosomes were first shown to be organized and later shown to occupy particular territories in the nucleus; chromosome properties such as size and gene density were found to be important in the nuclear positioning of the chromosome. In fact, a correlation between transcriptional silencing and localization to the nuclear periphery has been suggested. Gene-rich chromosomes have been observed to occupy the interior of the nucleus, while gene-poor chromosomes have been seen to localize at the nuclear periphery (for review see [2] and [3]).

In yeast, the interaction between the chromosome and nuclear periphery can be mediated by telomeres [4]. Telomeres are DNA-protein complexes at the physical ends of the chromosomes that function to protect chromosomal extremities against end-to-end fusions and degradation by nucleases. They are also important for the replication of chromosomal ends.

Telomeres show a conserved structure of G-rich tandemly repeated DNA sequences extending toward the chromosome extremities and ending in a 3' overhang. The telomere repeat sequence 5'-TTAGGG-3' is shared between phylogenetically unrelated organisms, such as vertebrates, and early diverging eukaryotes, such as the trypanosomatids [5].

Trypanosomatids are flagellated protozoa of medical importance as the causes of parasitic diseases such as leishmaniasis, Chagas' disease, and African trypanosomiasis. Of these three diseases, leishmaniasis is the most geographically widespread: it is present in over 80 countries and puts around 350 million people worldwide at risk of infection (WHO/TDR). There are over 20 *Leishmania* species pathogenic to humans, and no vaccines exist against any of them. The available treatments frequently show low efficacy and considerable toxicity.

Trypanosomes have peculiar biological features such as polycistronic transcription and *trans*-splicing. In the *trans*-splicing reaction, long polycistronic messages are processed by addition of a 30–40 nucleotides RNA derived from the spliced leader gene at the 5' end of each cistron, followed by addition of a poly(A) tail at

the 3' end. Transcription is constitutive for almost all genes characterized to date and overall transcription rates vary according to the parasite developmental stages [6]. Thus, most regulation of gene expression in trypanosomes seems to occur posttranscriptionally, either by modulation of the stability of the processed mRNAs or by translational control (reviewed in [7]).

The life cycle of the *Leishmania* parasite comprises two stages: amastigote, the intracellular stage found in mammalian cells (human stage); and promastigote, the extracellular stage found in the insect vector (insect stage). The most studied species, *Leishmania major*, has a 32-megabase genome and 8200 protein-coding genes distributed on 36 chromosomes [8].

Telomeres in *Leishmania* are known to be heterogeneous in structure [9] and unlike what is found in other pathogenic protozoa, *Leishmania major* subtelomeric regions do not contain genes coding for the surface molecules frequently associated with parasite virulence [10]. Instead, *L. major* contains clusters of housekeeping genes extending up to 5 kb away from the telomeres [8].

The telomeric localization of virulence genes could provide increased opportunities to generate variability, as it is suspected of enhancing recombination creating new antigenic variants in *Trypanosoma brucei* and *Plasmodium* [11], [12], [13], [14]. In this process, the nuclear architecture may play a role in increasing the emergence of new antigenic and adhesive variants, in the same way that has been suggested for *P. falciparum*. The telomeres of *P. falciparum* lie in clusters of 4–7 chromosome ends in the nuclear periphery, and this clustering is thought to enhance recombination of subtelomeric genes like those of the *var* gene family [14].

Little is known about nuclear organization in *Leishmania* parasites. Given that these parasites are devoid of antigenic variation and their subtelomeric regions do not harbor virulence genes as seen for other protozoan parasites, we wanted to know whether *Leishmania* telomeres are organized in clusters. In addition, given that transcription in these parasites is polycistronic and constitutive, we wanted to know the distribution of the *Leishmania* telomeres in the nucleus, since in other models telomeres are often seen at the nuclear periphery associated with transcriptional silencing. To answer these questions we investigated the spatial organization of *Leishmania major* telomeres in the insect stage, and we extended this analysis to the intracellular human stage. The small-sized nucleus and complex telomere hybridization patterns in this organism made it impossible to study telomere dynamics using available methods. In order to have more accurate measures and obtain robust statistics on telomere localization within the nucleus, we developed a fully automated 3D image processing system to extract nuclei and detect telomere.

In this paper we describe the telomere organization found in *Leishmania* parasites, we compare the organization/distribution found in nuclei in the human stage and the insect stage, and we discuss the possible implications of these findings for understanding the biology of the parasite.

Materials and Methods

Parasites

Leishmania major MHOM/IL/81/Friedlin promastigotes (insect stage) were cultivated in M199 (Sigma) with 40 μ M HEPES (pH 7.5), 20 μ g/ml gentamicin, and 10% heat-inactivated fetal bovine serum at 28 °C.

Amastigote preparation (human stage)

Mouse macrophage cell line J774A.1 was maintained in RPMI 1640 with L-glutamine (300 mg/L), 25 mM HEPES (pH 7.5)

(GIBCO), 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 10% heat-inactivated fetal bovine serum at 37 °C and 5% CO₂. Macrophages were infected with exponentially growing promastigotes diluted to 2 \times 10⁵ cells/ml and cultured 5 days prior to infection to allow them to reach stationary phase. The cells were then harvested and washed with RPMI 1640 medium before infection. In a 24-well plate, macrophages were added at 1 \times 10⁵ cells/ml and incubated for one day prior to infection. On the day of infection, cells were washed once with medium and infected at a ratio of 1:10 (host cell:parasite) for 48 h at 37 °C and 5% CO₂. After this period, cells were washed 3 times with PBS and processed for telomere detection as follows.

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

Leishmania major telomeres were detected by FISH using a telomere PNA probe (Telomere PNA FISH kit/FITC, DakoCytomation) according to the manufacturer's protocol except for the fixation step, which was performed with 3.7% formaldehyde (Sigma) for 15 minutes. In addition, the manufacturer's pre-treatment step was omitted.

To dissociate telomeric clusters, cells were treated with 0.05% proteinase K for 10 s prior to fixation [15], then submitted to FISH with the telomere PNA probe. Z-series images covering the whole nucleus were taken at distance intervals of 0.1 μ m by exceeding the DAPI signal in a Nikon Eclipse 90i microscope using a 100 \times /1.4 Plan ApoVC lens and a Nikon DS-QiMc camera or a Zeiss LSM5 Line Scanning Confocal Microscope.

Automated Image analysis

A. Nuclei detection and segmentation. First, all the parasites were automatically cropped from the 3D images by isolating each nucleus-kinetoplast pair. Then, a novel 3D analysis framework based on deformable models called "active meshes" was employed [16]. For each parasite, a mesh was used to detect the boundary of the kinetoplast, while another mesh was simultaneously used to detect the boundary of the nucleus. The mesh representation allowed the measurement of distances relative to the nuclear membrane and a 3D visualization that was fast and accurate.

B. Telomere cluster localization. Telomere clusters are small compared to the resolution limit of current optical microscopes. Therefore they appear on the images as the representation of the microscope's point spread function (PSF) [17]. This phenomenon is taken into account during the detection process, which consists of two steps. First, the image voxels with high curvature values are extracted. Then, a Gaussian approximation of the PSF is fitted to each pre-localized cluster to refine its localization in real space coordinates [18]. The intensity of each cluster is given by the estimated intensity value at cluster localization. For a proper comparison of the data from populations in the human or insect stages, the measured cluster intensities of each population were standardized by subtracting their respective population mean value, and dividing by their respective population standard deviation.

To compare the relationship between intensity and cluster position, a relative intensity value was calculated for each cluster. This relative intensity was calculated by dividing the cluster intensity value by the sum of all cluster intensity values from the same nucleus, thereby converting the intensity to a fraction of the whole cell intensity. This step made it possible to compare cluster intensities between different cells.

To study the spatial organization of the clusters in each population and across all nuclei, we computed a relative location of each cluster along the nuclear radius as shown in Figure 1.

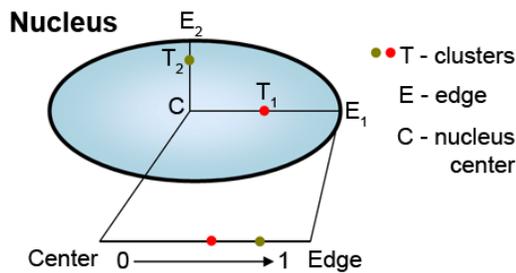


Figure 1. Scheme to illustrate determination of cluster position. Each cluster location **T** was projected on the detected membrane (mesh) using the vector formed by the center **C** of the nucleus and the cluster location **T**. This projected point **E** was then used to compute the ratio CT/CE , there normalizing all the relative cluster locations across all experiments to a ratio between 0 and 1. doi:10.1371/journal.pone.0002313.g001

Results

Telomeres are clustered in *Leishmania* parasites

In FISH, hybridization of probe to target DNA is obtained through somewhat harsh fixation steps, high denaturation temperatures, and stringent washing conditions, sometimes leading to disruption of nuclear ultrastructure [19] [20]. We hypothesized that by using lower hybridization temperatures, we could better conserve this ultrastructure. Compared to DNA probes, peptide nucleic acid (PNA) probes show improved hybridization characteristics: they hybridize efficiently at low ionic strength, and their hybridization is more specific and faster (30–45 min), allowing milder hybridization protocols and resulting in lower background. Furthermore, PNAs are resistant to both protease and nuclease degradation (reviewed by [21] and [22]).

Therefore, we decided to take advantage of PNA probes in order to study the 3D distribution of telomeres in *Leishmania* parasites. We performed FISH experiments in both *L. major* insect and human intracellular stages using a PNA probe complementary to the telomeric repeat of *Leishmania* parasites. As shown in Figure 2A, *L. major* telomeres were found in a speckled pattern, dispersed throughout the nucleus in both human and insect stages of the parasite.

Telomeres cluster with one another to form discrete foci tethered to the nuclear periphery, and this peripheral localization can modulate gene expression (reviewed by [23]). In order to verify whether *L. major* telomeres are organized in clusters, we performed proteinase K digestion of nuclei prior to cell fixation [15]. As expected, proteinase K treatment disrupted the overall nuclear structure. After this treatment, the number of telomere spots increased, indicating that telomeres were indeed associated in clusters, and that the clusters might have been disrupted by digestion.

The localization of telomeres was then assessed by automated image analysis of 3D series of *L. major* nuclei from insect and human stages. Determination of nuclear volume was carried out using the active mesh framework method (as described previously). One advantage of using this framework is that the Z-series are processed as a full volume, in contrast to methods in which each Z-slice is processed independently. Another advantage of our approach is that the meshes are permanently rendered during the detection process; thus there is no difference between what is seen on the screen and the model processing the data.

Interestingly, the observed average number of clusters in both stages is 16, suggesting that the number of clusters may be important for the parasite (Fig. 2B). Given that *L. major* has 36 chromosomes, an average of 4–5 chromosome ends are associated

in each cluster. When we treated the cells with proteinase K before fixation, we obtained an average of 30 telomere spots per nuclei (Fig. 2B). These results provide evidence that *L. major* telomeres are in clusters brought together through protein interactions. Moreover, since *L. major* has 72 chromosome ends, our findings suggest that even after physical disruption of the clusters, telomeres may remain in close association. It is important to note that *Leishmania* chromosomes have never been observed in condensed states and thus the PNA-FISH system cannot be tested on *L. major* metaphase plates. Therefore, it is not possible to know precisely the resolution limit of this technique for detecting *L. major* telomeres. Nevertheless, it has been shown to detect more than 90% of telomeres in metaphase plates preparations from mammals [24,25].

Differences in telomere cluster location unveiled through precise automated assignment of cluster nuclear position

After measuring the positions of hundreds of clusters in the nuclei of both *L. major* stages, we decided to analyze the distribution of the clusters. Nuclei from human and insect stages were identified based on DAPI signal and segmented as described in the Methods section. Each telomeric cluster was assigned a relative location along the nuclear radius. Even though telomere clusters are widespread throughout the nucleus during both stages, they concentrate in central areas more frequently than would be expected for random distribution, as shown in Figure 3. Moreover, the position of the telomere clusters differs between the two stages: clusters are more concentrated near the center of the nucleus in the human stage than in the insect stage. Another way of looking at these data is to divide the nucleus in two parts of identical volume, one being internal and the other external (Figures 4B and 4C, dotted vertical lines). This procedure reveals that ~85% of clusters in the human stage, but ~50% of clusters in the insect stage, are distributed in the internal half of the nuclear volume. Thus, transition to the human stage reduces the fraction of clusters in the external half of the nuclear volume to 15%, which means that the telomeres are repositioned to the center of the nucleus.

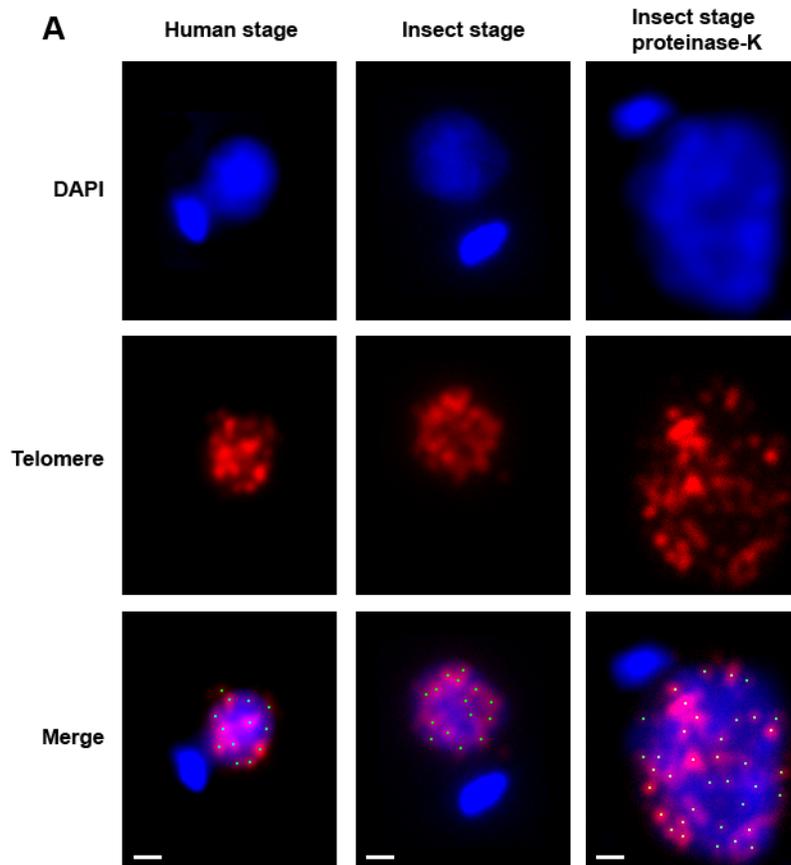
This suggests a spatial reorganization of *L. major* telomere clusters upon transition between stages of the parasite life cycle.

Analysis of telomeric cluster intensity suggests reorganization between human and insect stages

The observed spatial reorganization of telomeric clusters between insect and human stages prompted us to investigate whether the composition of clusters also changed between the two stages.

The intensity of a telomeric cluster depends on the number of telomeric repeats present on each cluster. The number of repeats, however, can be attributed to the number of repeats within a single chromosome extremity as well as to the number of extremities present in each cluster. To our knowledge, there is no evidence so far that the repeat number within the chromosomes changes between insect and human stages. We therefore assume that the intensity of telomeric clusters depends solely on the number of chromosomes associated in each telomeric cluster.

For proper comparison of the data from human and insect stages, the measured cluster intensities of each population were standardized by subtracting their respective population mean value, then dividing by their respective population standard deviation. Figure 4A shows a comparison of the standardized cluster intensity distribution between human and insect stages. Surprisingly, the overall pattern of clusters intensity changes from one stage to the other, suggesting that chromosomal distribution in telomeric clusters changes upon *L. major* cellular differentiation.



B

	Human stage	Insect stage	Insect stage proteinase-K
Average Cluster per cell	16.7 (± 4.8)	16 (± 3.3)	29.6 (± 6.6)
Clusters analyzed	952	879	1596

Figure 2. Telomeres are organized in clusters in *Leishmania major*. (A) Cells were analyzed by FISH using a fluorescent telomere PNA probe as described in Methods. DNA was stained with DAPI. 2D maximum intensity projection of Z-series showing telomeric clusters found in nuclei in the human stage (left column) and insect stage (middle column). Nuclei in the insect stage were treated with Proteinase K (right column) prior to fixation to examine whether telomeres are found in clusters. (B) Table showing the quantification of telomeric FISH foci as shown in (A). Bar, 1 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0002313.g002

To further gain insights into telomere distribution among the clusters, we correlated the intensity of clusters to their nuclear position. In both insect and human stages, the most intense clusters tend to be centrally located (Figures 4B and 4C). At present it is not known whether this differential distribution is biologically relevant, and whether it is due to differences in the distribution of chromosomes according to telomere size, or to a different number of chromosomes per telomeric cluster.

In order to facilitate the visualization of spatial distribution of telomeres in *Leishmania* parasites, 3D models were produced for both the human and insect stages (Figure 5A and 5B, respectively, and supplemental movies S1 and S2).

Discussion

Here we have shown that *Leishmania major* telomeres are organized in clusters in both stages of the parasite life cycle. We have also observed that the number of clusters per cell does not change between the different life stages, suggesting that it may be important for parasite nuclear biology. Interestingly, the positioning of these clusters in the nucleus changes from one stage of the life cycle to the other. In the human stage, the clusters are more concentrated in the nucleus center, although in both stages clusters are found throughout the whole nuclear space. A comparison of cluster intensities shows that there is a reorganization of the

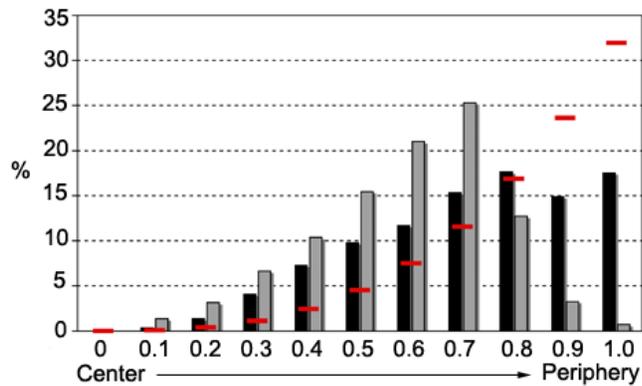


Figure 3. Telomeric clusters are widespread in the nucleus but concentrated in central areas. Comparison of the spatial distribution of telomeric clusters in nuclei in the human stage (gray bars, $n=952$) and insect stage (black bars, $n=879$) relative to the center of the nucleus (defined as position zero). The red lines show the values expected for random distribution. Below, the arrow illustrates the clusters distribution towards the nuclei.
doi:10.1371/journal.pone.0002313.g003

nucleus when the parasites differentiate from one stage to the other, with cluster intensities being more homogeneous in the human stage. In both stages, however, we show that the clusters with the highest intensities are kept at more internal positions in the nucleus, while clusters of lower intensities localize towards the periphery.

The organization of *Leishmania* telomeres in clusters is comparable to the situation observed in other eukaryotic cells. In yeast, telomeres are clustered and tethered to the nuclear periphery. Association with the nuclear periphery correlates with gene silencing at the telomeres, where genes are closer to the pools

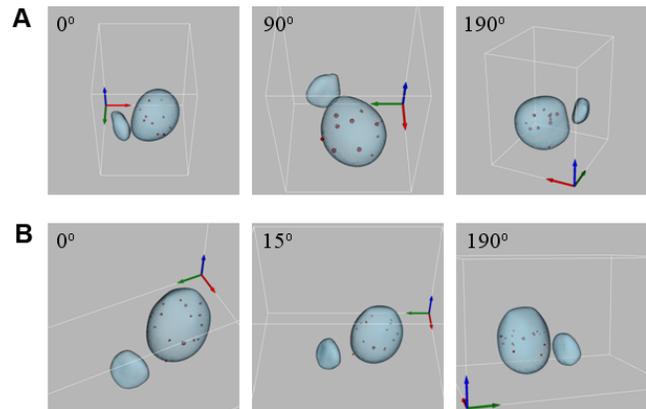


Figure 5. Three-dimensional views of an *L. major* nucleus showing the spatial distribution of telomeric clusters. Nucleus and kinetoplast are shown in blue and telomeric clusters in red. Differences in cluster intensity reflect differences in cluster size. The views are rotated clockwise with the angles indicated at the top of each panel. (A) Human stage nucleus. (B) Insect stage nucleus. Bar, 1 μm .
doi:10.1371/journal.pone.0002313.g005

of silencing proteins such as the Sir proteins. This transcriptional inhibition due to the telomeric localization of a gene is called the telomere position effect (TPE), and association of the telomeres with the periphery is thought to be necessary for TPE to occur (reviewed in [26]). For example, telomeric repression in trypanosomes has been demonstrated for genes encoding variant surface molecules (VSG) in *T. brucei* [27]. However, the importance of the nuclear localization in this process remains unclear. It has been suggested that perinuclear localization facilitates transcriptional repression in the stage of the parasite that does not express the VSG genes and that in order to be expressed, the VSG gene

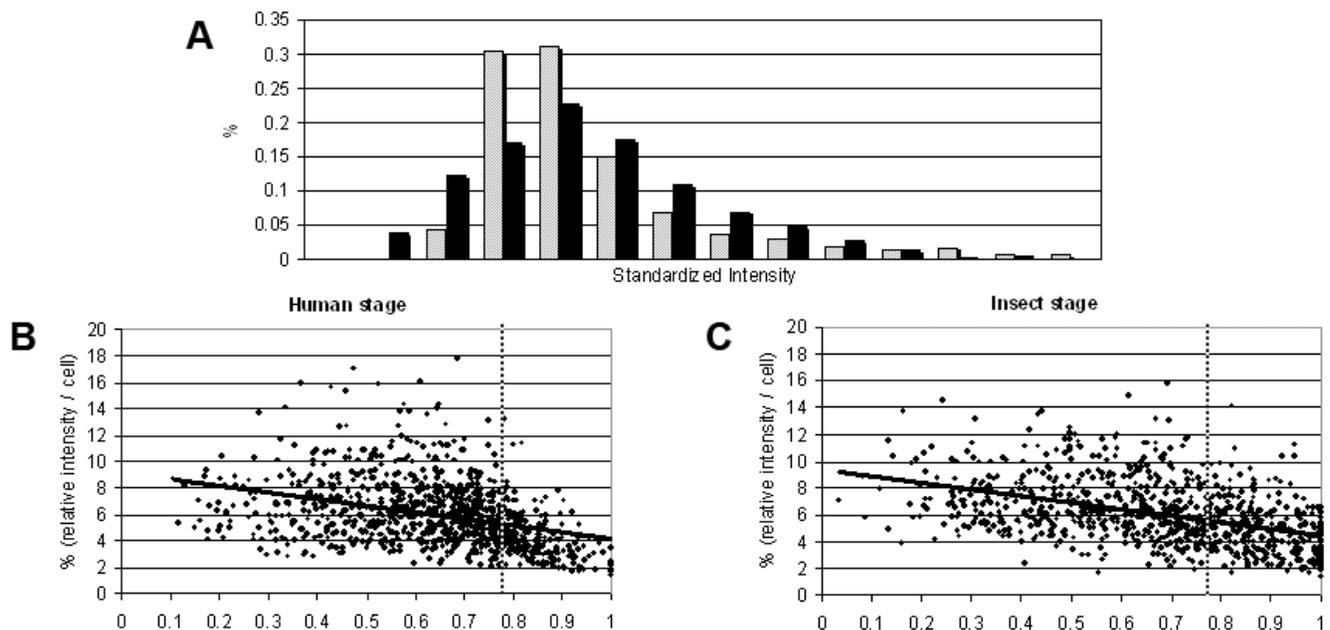


Figure 4. Telomeric clusters are reorganized between the human and insect stages. (A) Standardized intensity comparison of telomeric clusters between human stage (gray bars) and insect stage (black bars). (B and C) Correlation between the cluster intensity (intensity percentage relative to each cell) and relative cluster position in nuclei at the human stage (B) and insect stage (C). The values in the abscissa represent the relative distance of the clusters in relation to the center of the nucleus, defined as position zero. The trend lines are adjusted to linear regressions, and the dotted lines define the radius used to divide the nucleus in two parts of identical volume, one being internal and the other external.
doi:10.1371/journal.pone.0002313.g004

moves away from the periphery towards the center of the nucleus ([28] and for review see [29]).

We have observed that *Leishmania major* telomere clusters are not concentrated at the nuclear periphery but instead are distributed throughout the nucleus. Unlike what is seen for *Trypanosoma brucei*, *L. major* subtelomeric regions do not contain genes coding for surface molecules [8] [10]. The presence of housekeeping genes at the subtelomeric regions of *Leishmania* may explain the distribution of the telomeres throughout the nucleus.

Besides the lack of perinuclear localization of the telomeres, we have also observed that *Leishmania major* telomeres are reorganized in the nucleus during the life cycle. In *T. cruzi*, an extensive redistribution of the heterochromatic regions occurs during the life cycle and is associated with changes in the transcriptional status of the cell [6]. We have shown that in both stages of the parasite life cycle the more intense clusters are found in central positions and clusters of lower intensity localize towards the periphery. The role of chromatin in this organization was not examined and therefore cannot be ruled out. It is possible that the decrease in cluster intensity reflects a difference in probe accessibility due to more compact heterochromatin in the periphery compared to more relaxed and accessible euchromatin in central regions. Whether the reorganization of *Leishmania* telomeres reflects a more extensive and general reorganization of the chromatin remains to be elucidated, as does the functional importance of the telomere reorganization itself.

References

- Cabal GG, Genovesio A, Rodriguez-Navarro S, Zimmer C, Gadal O, et al. (2006) SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope. *Nature* 441: 770–773.
- Spector DL (2003) The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu Rev Biochem* 72: 573–608.
- Pombo A, Branco MR (2007) Functional organisation of the genome during interphase. *Curr Opin Genet Dev* 17: 451–455.
- Hediger F, Gasser SM (2002) Nuclear organization and silencing: putting things in their place. *Nat Cell Biol* 4: E53–55.
- Blackburn EH (1990) Telomeres: structure and synthesis. *J Biol Chem* 265: 5919–5921.
- Elias MC, Marques-Porto R, Freymuller E, Schenkman S (2001) Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organization. *Mol Biochem Parasitol* 112: 79–90.
- Campbell DA, Thomas S, Sturm NR (2003) Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect* 5: 1231–1240.
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, et al. (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309: 436–442.
- Conte FF, Cano MI (2005) Genomic organization of telomeric and subtelomeric sequences of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Int J Parasitol* 35: 1435–1443.
- Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, et al. (2007) Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 39: 839–847.
- Corcoran LM, Thompson JK, Walliker D, Kemp DJ (1988) Homologous recombination within subtelomeric repeat sequences generates chromosome size polymorphisms in *P. falciparum*. *Cell* 53: 807–813.
- Ravel C, Wincker P, Bastien P, Blaineau C, Pages M (1995) A polymorphic minisatellite sequence in the subtelomeric regions of chromosomes I and V in *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol* 74: 31–41.
- Taylor HM, Kyes SA, Newbold CI (2000) Var gene diversity in *Plasmodium falciparum* is generated by frequent recombination events. *Mol Biochem Parasitol* 110: 391–397.
- Freitas-Junior LH, Bottius E, Pirrit LA, Deitsch KW, Scheidig C, et al. (2000) Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature* 407: 1018–1022.
- Marty AJ, Thompson JK, Duffy MF, Voss TS, Cowman AF, et al. (2006) Evidence that *Plasmodium falciparum* chromosome end clusters are cross-linked by protein and are the sites of both virulence gene silencing and activation. *Mol Microbiol* 62: 72–83.
- Dufour A, Lee LH, Vincent N, Grailhe R, Genovesio A (2007) 3D automated nuclear morphometric analysis using Active Meshes. Singapore: Springer. pp 356–367.
- Dusch E, Dorval T, Vincent N, Wachsmuth M, Genovesio A (2007) Three-dimensional point spread function model for line-scanning confocal microscope with high-aperture objective. *J Microsc* 228: 132–138.
- Thompson RE, Larson DR, Webb WW (2002) Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys J* 82: 2775–2783.
- Kozubek S, Lukasova E, Amrichova J, Kozubek M, Liskova A, et al. (2000) Influence of cell fixation on chromatin topography. *Anal Biochem* 282: 29–38.
- Solovei I, Cavallo A, Schermelleh L, Jaunin F, Scasselati C, et al. (2002) Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during three-dimensional fluorescence in situ hybridization (3D-FISH). *Exp Cell Res* 276: 10–23.
- Ray A, Norden B (2000) Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *Faseb J* 14: 1041–1060.
- Summerton J (2003) Morpholinos and PNAs compared. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 10: 215–236.
- Taddei A, Gasser SM (2004) Multiple pathways for telomere tethering: functional implications of subnuclear position for heterochromatin formation. *Biochim Biophys Acta* 1677: 120–128.
- Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, et al. (1996) Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 5: 685–691.
- Chuang TC, Moshir S, Garini Y, Chuang AY, Young IT, et al. (2004) The three-dimensional organization of telomeres in the nucleus of mammalian cells. *BMC Biol* 2: 12.
- Tham WH, Zakian VA (2002) Transcriptional silencing at *Saccharomyces* telomeres: implications for other organisms. *Oncogene* 21: 512–521.
- Glover L, Horn D (2006) Repression of polymerase I-mediated gene expression at *Trypanosoma brucei* telomeres. *EMBO Rep* 7: 93–99.
- Perez-Morga D, Amiguet-Vercher A, Vermijlen D, Pays E (2001) Organization of telomeres during the cell and life cycles of *Trypanosoma brucei*. *J Eukaryot Microbiol* 48: 221–226.
- Navarro M, Penate X, Landeira D (2007) Nuclear architecture underlying gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Trends Microbiol* 15: 263–270.

Supporting Information

Movie S1 Three-dimensional reconstruction of an *L. major* nucleus showing the spatial distribution of telomeric clusters in *L. major* human stage. Nucleus and kinetoplast are shown in blue and telomeric clusters in red. Differences in cluster intensity reflect differences in cluster size. This reconstruction was based in 3D images from a single parasite.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0002313.s001 (2.15 MB MOV)

Movie S2 Three-dimensional reconstruction of an *L. major* nucleus showing the spatial distribution of telomeric clusters in *L. major* insect stage. Nucleus and kinetoplast are shown in blue and telomeric clusters in red. Differences in cluster intensity reflect differences in cluster size. This reconstruction was based in 3D images from a single parasite.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0002313.s002 (2.72 MB MOV)

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Peter Sommer for critically reviewing the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AG LF FD JS MC. Performed the experiments: FD AD ED CM GY. Analyzed the data: LF FD AD ED JS CM. Contributed reagents/materials/analysis tools: LF. Wrote the paper: LF FD AD JS CM.

3D SPATIAL DRIFT CORRECTION USING KALMAN FILTERING FOR FLUORESCENCE BASED IMAGING

T. Dorval¹, CB. Moraes², A. Ogier¹, LH. Freitas-Junior² and A. Genovesio¹

¹Image Mining Group, ²Systems Biology of Pathogens
Institut Pasteur Korea
39-1, Hawolgok-dong, Seongbuk-gu, Seoul, 136-791, Korea

ABSTRACT

In this paper we present a framework for correcting the spatial drift that can occur in 3D optical fluorescence microscopy images. These shifts happen during long time acquisition and can corrupt further analysis. This artifact has to be taken into account especially if the application requires an high spatial detection accuracy. Our correction method is based on the use of a microsphere located within the biological assay. As the bead does not provide the same correction quality for each Z-slice, we propose here, to include a level of confidence depending on the depth in a Kalman filtering process. This framework allows then to extend the motion compensation along the complete 3D images. This method is validated on real data and provides an easy and accurate way to correct 3D images corrupted along Z by a XY motion.

Index Terms— microscopy, image processing, Kalman filtering, image enhancement.

1. INTRODUCTION

To introduce our technique in a practical way, we focus on a specific biological application in which we want to localize in 3D the transcription sites within a nucleus. As this application requires an important accuracy in its spatial measures, and as the spatial dimensions of the biological objects are close to the microscope resolution, high quality images are required. In this case, and as it is difficult to denoise properly images subjected to Poisson noise, a common choice is to improve the signal to noise ratio by increasing the acquisition time and/or by operating multiple slices (or lines) intensity averaging. The primary consequence of such averaging is the drastic increase of acquisition time, leading to intrinsic motions (see figure 1) such as thermal drift.

We propose here to overcome this drawback by adding a focal bead within the biological preparation (frequently used in fluorescence microscopy), assuming that the motion is constant over each 2D z slice. Moreover, as the objects of interest and the bead are randomly spread over the 3D biological preparation, we need to compensate the Z motion in the complete 3D image by extending the slice by slice disk tracking

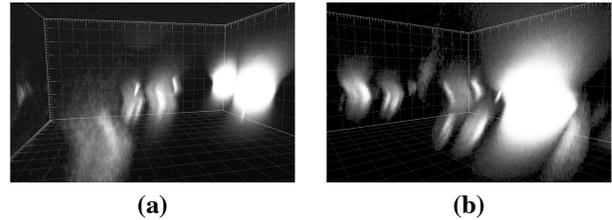


Fig. 1. These figures display two different situations in which the shift is obvious and important.

using a Kalman filtering.

The paper is organized as follow. Section II describes standard approach for motion compensation and its limits. Section III extends the correction algorithm by using Kalman filtering. Results on real images are presented in section IV and finally section V concludes this paper.

2. MOTION COMPENSATION

In confocal microscopy, a 3D stack $I(x, y, z)$ is composed of a succession of 2D slices $I_z(x, y)$ of small optical sections. These images are corrupted by numerous artifacts such as point spread function blurring, Poisson noise, intensity loss, spatial aberrations and in our case mis-alignment of each z slice.

In our application, the correction process is initiated by a user-based selection of a 2D region of interest containing the complete bead across all the z sections, taking into account a possible drift along the Z-axis. This selection is extended for all the z slices, providing the 3D image $I'(x, y, z)$. As a preliminary approach, we consider that for each slice $I'_z(x, y)$, the gravity center \mathbf{x}_z of the image corresponds to the gravity center of the sphere sectioning at this z position (see figure 2). Indeed, the sphere intensity is much more important than the background one, and thus the resulting center of mass for each z slice is mainly driven by the disk.

Such straightforward method provides a vector $\mathbf{V} = [\mathbf{v}_{z=0}^T, \mathbf{v}_{z=1}^T, \dots, \mathbf{v}_{z=n}^T]^T$, where $\mathbf{v}_z = [v_x(z), v_y(z)]^T$ are the 2D floating point vectors representing the motion of each z

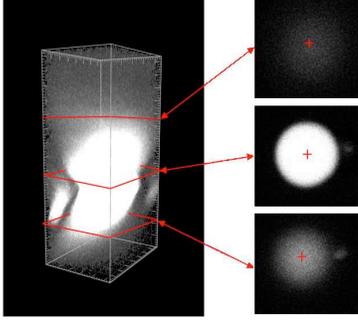


Fig. 2. Example of a selected crop $I'(x, y, z)$ of a highly deformed image and three z stacks $I'_z(x, y)$ illustrating that the image $I'_z(x, y)$ center of mass position is bad located.

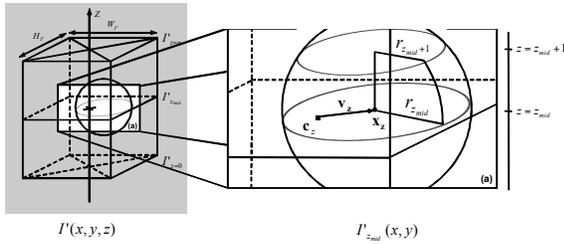


Fig. 3. Schematic representation of the cropped region of interest containing the bead. This figure displays the notations used in this paper.

slice (see figure 3). If we note \mathbf{c}_z the geometrical center of the 2D image I'_z , a first naive estimation of the motion is:

$$\mathbf{v}_z = \mathbf{x}_z - \mathbf{c}_z.$$

During the correction step, the rigid transformations given by the vectors \mathbf{v}_z are applied to the images $I_z(x, y)$ by the following equation:

$$\tilde{I}_z(x, y) = I_z(x - v_x(z), y - v_y(z)),$$

where \tilde{I}_z is the corrected image at the z position. The interpolating function used in our application is a bilinear one, combining speed and accuracy. Even if this model provides a quite good correction for the z stacks corresponding to the middle of the sphere, there is a important loss of accuracy regarding the stacks out of this zone.

To overcome this drawback we propose to extend this model by including a detection confidence factor within the vector \mathbf{v}_z computation. This confidence is included in our correction framework using a linear Gaussian Bayesian filter so called Kalman filter [1].

3. KALMAN FILTERING EXTENSION

Because the disk radius r_z resulting from the sphere sectioning is fluctuating along the z axis, the localization accuracy

of the center of mass is also subjected to an error. The worse signal-to-noise ratio we have, the more the center of mass estimation is corrupted by the background, and thus converge to the center \mathbf{c}_z of the cropped image I'_z (see curves (1) on figure 6). This is a major issue since the biological object of interest we aim to correct may not be located at the same level as the bead.

Therefore, we do not to use the measurements directly but estimate the location of this projection by incorporating assumptions on the evolution of this location thanks to a Kalman filter. This filtering method is used in many fields, especially in object tracking [2, 3, 4].

At each level z we obtain a measurement \mathbf{m}_z , and we aim to estimate the density of the true value \mathbf{x}_z assuming the following system:

$$\begin{cases} \mathbf{x}_z &= \mathbf{F}_z \mathbf{x}_{z-1} + \nu_z & \text{with } \nu_z \sim \mathcal{N}(0, \mathbf{Q}_z) \\ \mathbf{m}_z &= \mathbf{H}_z \mathbf{x}_z + \mu_z & \text{with } \mu_z \sim \mathcal{N}(0, \mathbf{R}_z) \end{cases}$$

where \mathbf{F}_z denotes the state transition matrix and \mathbf{Q}_z the transition noise covariance matrix, \mathbf{H}_z the observation matrix and \mathbf{R}_z the observation noise covariance matrix. The Kalman filter allows to obtain recursively an optimal estimate of a Gaussian state density $p(\mathbf{x}_z | \mathbf{m}_z, \dots, \mathbf{m}_0) = \mathcal{N}(\hat{\mathbf{x}}_z | z, \mathbf{P}_z | z)$. The notation $\hat{\mathbf{x}}_{z_i | z_j}$ represents the estimate of \mathbf{x} at the position z_i given observations up to, and including z_j . Following the fact that the displacement of the center of mass across levels is rather smooth, we consider a system driven by a locally constant speed transition automatically updated. Consequently, the state and measurement vectors \mathbf{x}_z , \mathbf{m}_z and the matrices \mathbf{F}_z , \mathbf{H}_z are constructed as follows [5]:

$$\mathbf{x}_z = [x_z, y_z, x_{z-1}, y_{z-1}]^T \quad \mathbf{m}_z = [x_z, y_z]^T,$$

in accordance with the following system parameters:

$$\mathbf{F}_z = \begin{bmatrix} 2 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 2 & 0 & -1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad \mathbf{H}_z = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \end{bmatrix},$$

$$\mathbf{Q}_z = \mathbf{I}(4) \quad \mathbf{R}_z = \alpha_z \mathbf{I}(2), \quad (1)$$

where $\mathbf{I}(n)$ denotes the identity matrix of dimension n .

The initial step of the process is realized on $z = z_{mid}$ corresponding to the middle of the sphere. This stack has important properties: it displays the best signal-to-noise-ratio and it can be easily located using the integrated intensity function. Indeed, z_{mid} corresponds to the stack presenting a maximum of intensity along the z -axis. This choice enables to initiate the filtering with a maximum of confidence in the detection step. From now, we split $I'_z(x, y)$ in two parts, each of them starting from z_{mid} and ending respectively at the top ($z = 0$) and the bottom ($z = n$) of $I'_z(x, y)$. In the following, we consider the top part, the same procedure is then applied equivalently to the bottom part of $I'_z(x, y)$.

For each level z a measurement \mathbf{m}_z is provided by computing the 2D image $I'_z(x, y)$ center of mass. A Kalman prediction-estimation iteration provides an estimate $\hat{\mathbf{x}}_{z|z}$ of the disk location and its covariance $\mathbf{P}_{z|z}$ given our system, and thus allows to predict the \mathbf{v}_{z+1} considering the previous states and the detection confidence.

Setting precisely the parameters of a Kalman filter such that they match with the reality is difficult in many applications but is nevertheless of primary importance since the filter system represents prior knowledge which somehow regularizes our measurements. In our case, most parameters sound pretty close from the reality: the transition matrix corresponds to a locally smoothed interpolation and the transition noise is reestimated thanks to the method that we proposed in [5].

Nevertheless, a crucial remaining issue is to set the measurement covariance noise α_z representing the confidence of the measurement at each level z and therefore has to be iteratively updated. In order to do this, we propose to evaluate the center of mass localization error ΔE occurring at each z considering the physical properties of the system, i.e.: the sphere radius r_z , the region of interest I'_z width $W_{I'}$ and height $H_{I'}$, the background and the sphere mean intensity, respectively \bar{I}_b and \bar{I}_s . $W_{I'}$ and $H_{I'}$ are immediately provided by the user selection.

Moreover, at the level z_{mid} , the disk size in pixel is perfectly known thanks to the microscope resolution and the physical dimensions of the bead. Thus, we can segment accurately the disk and consequently define precisely \bar{I}_b , \bar{I}_s and $r_{z_{mid}}$ (noted also r_0 for more convenience). The disk radius at any slice z is straight-forwardly given by:

$$r_z = \begin{cases} \sqrt{r_0^2 - (z - z_{mid})^2} & \text{if } |z - z_{mid}| \leq r_0 \\ 0 & \text{if } |z - z_{mid}| > r_0 \end{cases}$$

If we consider that we have no prior about the disk Γ_z position within I'_z (i.e. an uniform distribution of the probability of presence over the 2D array), we can therefore compute the probability distribution of the center of mass of the system (disk and background). The resulting error ΔE is the Euclidean distance between the center of mass and the real disk center illustrated in figure 5.a. To compute the system center of mass \mathbf{m}_z , we split I'_z in N constant intensity areas A_n with their associated barycenters \mathbf{b}_n (see figure 5.b). The system center of mass is given by:

$$\mathbf{m}_z = \frac{\sum_{n=0}^{N-1} \omega_n \mathbf{b}_n}{\sum_{n=0}^{N-1} \omega_n},$$

where ω_n is the integrated intensity over the surface A_n . This process is iteratively operated over the area Ω representing I'_z sub-part in which the disk Γ_z remains uncropped, leading to a probability map for each z (see figures 5.c & 5.d).

We fit this probability map with a 2D Gaussian function to obtain the variance α_z to be inserted in the Kalman filter defined in equation (1). Figure 4 displays a typical example of α_z evolution considering the system parameters.

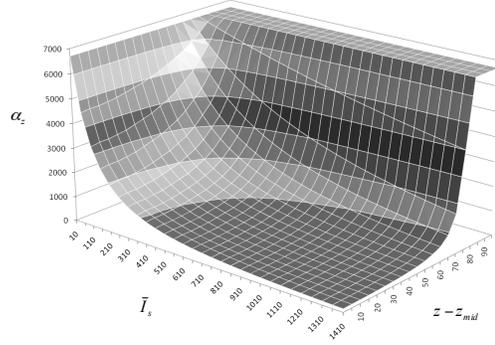


Fig. 4. This 3D curve displays the evolution of α_z for different values of z and \bar{I}_s . Here we choose $\bar{I}_b = 10$, $W = 800$, $H = 540$ and $r_0 = 77$.

4. VALIDATION

Evaluating the relevance of our correction scheme is difficult since it requires to possess a perfectly defined object located out of the reference bead domain. We propose here to validate our correction method by generating a bench of $400 \times 400 \times 150$ 3D images. Each image contains a sphere, randomly located (and thus inducing different user selections), of the same physical dimensions as the ones used in the previous sections. These images are submitted to a smooth motion in depth following parametric functions (low order polynomials and trigonometrics). To mimic as much as possible a real acquisition, we corrupt the deformed image by applying: (i) a 3D Gaussian blur, modeling the point spread function convolution, (ii) a Poisson noise and (iii) an additive Gaussian noise. Moreover, the deformation path is also submitted to Gaussian noise simulating the inaccuracy of the imaging process. Then, for each image we compute the Euclidean distance between the motion estimated using the center of mass of the cropped region and the corrected motion using the Kalman filtering process described in the previous sections. To increase the relevance of the validation, we average the results of each over five different user selections.

Table 1 displays the mean, the standard deviation and the maximum values of the distance functions described below realized for different motion types. Whatever the motion and the selection are, the Kalman filter always drastically improves the accuracy of the motion estimation. The residual error is mainly related to the Gaussian error added to the motion.

Moreover, figure 6 displays four other experimental motions before and after correction in a real context. It is clear that after filtering, the motion is no more attracted by the center of the cropped image, but continues and extrapolates the motion for the slices out of the bead domain. Finally, the figure 7 shows a bead before and after correction, highlighting the relevance of the correction for the bead.

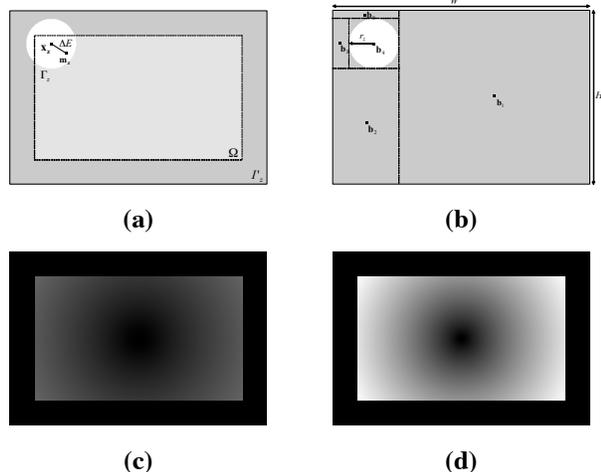


Fig. 5. Figures (a) & (b) display a schematic representation of the two main steps involved in the detection error modeling: (a) the scan of Ω and (b) the computation of I'_z center of mass. Finally, (c) & (d) represent two different probability distributions for a same system at different z .

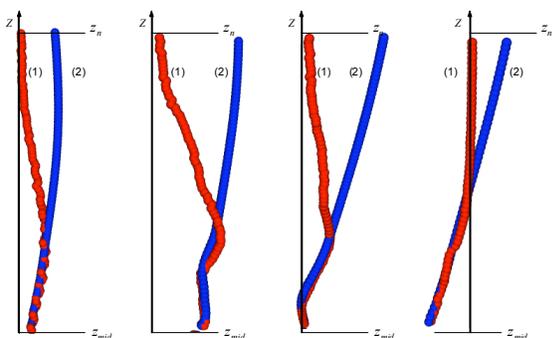


Fig. 6. Four different trajectories before (1), and after (2) Kalman based motion compensation.

5. CONCLUSION AND FUTURE WORKS

In this paper, we presented a method for correcting 3D microscopic acquisition subjected to smooth motion within the z stack. We used a bead physically included in the biological preparation and we extend the motion compensation framework by using a Kalman filter. The detection error is modeled on a theoretical computation of the center of mass position. This model provides a crucial information, usually missing in the Kalman filtering process: the variance of the detection error. Thanks to this knowledge, we can correct precisely, and automatically, the drift all over the 3D image. This framework can be used also to register in parallel multi-channel images. Finally, if the loss of intensity in depth is noticeable, relatively to the bead intensity, it can be interesting to include, in this process, an intensity decay model such as presented by

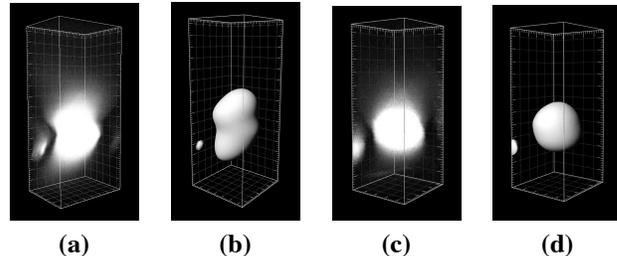


Fig. 7. (a) and (b) represent the bead before correction (respectively real 3D data and segmented image). (c) and (d) represent the same situation after correction.

	Mean (μm)		Std (μm)		Max (μm)	
Poly. 1	0.51	0.17	0.63	0.12	2.21	0.49
Poly. 2	0.81	0.19	0.63	0.09	1.99	0.47
Poly. 3	0.59	0.16	0.46	0.08	1.27	0.36
Trigo. 1	0.45	0.22	0.41	0.07	1.48	0.35
Trigo. 2	0.68	0.21	0.81	0.13	2.66	0.14

Table 1. Results obtained for 5 experiments. Each result is an average of 5 different user selections. The right and left cells of each result is respectively obtain with and without Kalman filter.

[6] by turning \bar{I}_b and \bar{I}_s into respectively $\bar{I}_b(z)$ and $\bar{I}_s(z)$.

6. REFERENCES

- [1] R. E. Kalman, "A New Approach to Linear Filtering and Prediction Problems," *Transactions of the ASME-Journal of Basic Engineering*, vol. 82, no. D, pp. 35–45, 1960.
- [2] Y. Bar-Shalom and T.E. Fortmann, *Tracking and Data Association*, Academic Press, New-York, 1988.
- [3] D.-S. Jang, S.-W. Jang, and H.-I. Choi, "2D human body tracking with structural Kalman filter," *Pattern Recognition*, vol. 35, pp. 2041–2049, 2002.
- [4] S. Gil and R. Milanes, "Comparing features for target tracking in traffic scenes," *Pattern recognition*, vol. 29, no. 8, pp. 1285–1296, 1996.
- [5] A. Genovesio, T. Liedl, V. Emiliani, W.J. Parak, M. Coppey-Moisan, and J.-C. Olivo-Marin, "Multiple particle tracking in 3D+T microscopy: methods and application to the tracking of endocytosed quantum dots," *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 15, no. 5, pp. 1062–1070, 2006.
- [6] C. Kervrann, D. Legland, and L. Pardini, "Robust incremental compensation of the light attenuation with depth in 3d fluorescence microscopy," *Journal of Microscopy*, vol. 214, no. 3, pp. 297–314, 2004.