

Escola Superior de Saúde Egas Moniz
Mestrado em Biologia Molecular em Saúde



**Construção do plasmídeo recombinante
necessário à obtenção do "knockout"
condicional da proteína Mob1 de
*Toxoplasma gondii***

Andreia Filipa da Silva Ferreira

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biologia
Molecular em Saúde

Setembro de 2014

Escola Superior de Saúde Egas Moniz
Mestrado em Biologia Molecular em Saúde



**Construção do plasmídeo recombinante
necessário à obtenção do "knockout"
condicional da proteína Mob1 de
*Toxoplasma gondii***

Andreia Filipa da Silva Ferreira

**Dissertação orientada por:
Doutora Sofia Bizarro Nolasco da Silva Narciso**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biologia
Molecular em Saúde

Setembro de 2014

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus Pais que diariamente me deram a força necessária para não fraquejar...

“Faze canteiros como os que outros têm,
Onde os olhares possam entrever
O teu jardim com lho vais mostrar.
Mas onde és teu, e nunca o vê ninguém,
Deixa as flores que vêm do chão crescer
E deixa as ervas naturais medrar. “

“Fernando Pessoa”

Agradecimentos

Mais do que um trabalho individual, esta dissertação é resultado da colaboração de várias pessoas num processo tudo menos solitário. Por esta razão quero expressar os meus sinceros agradecimentos:

Em primeiro lugar à Doutora Sofia Narciso, minha orientadora, por todo o seu saber, pelos seus conselhos e modo como sempre me apoiou e incentivou ao longo da realização deste projeto e especialmente pela paciência e simpatia com que sempre me recebeu, sendo um muito obrigado pouco para expressar a minha gratidão;

À Professora Doutora Alexandra, coordenadora do Mestrado em Biologia Molecular em Saúde, pela sua dedicação e empenho na concretização do Mestrado, e pela forma com que motiva os alunos;

Ao Samuel, por toda a disponibilidade que sempre demonstrou para me auxiliar na bancada, pelos ensinamentos numa fase de primeiro contacto com novas técnicas. Pela amizade e carinho com que sempre me aconselhou nos momentos mais desesperantes e quando me encontrava mais fragilizada;

À Alexandra, pela disponibilidade e carinho demonstrados para me auxiliar no desenvolvimento do trabalho;

Ao grupo de investigação do Doutor Alexandre Leitão: À Dulce, ao Afonso, ao João, à Sara, ao Eduardo e ao próprio Doutor Alexandre pela maneira tão simpática e carinhosa como me receberam e pela disponibilidade que sempre demonstraram para o esclarecimento de qualquer dúvida que surgisse e contributo científico para que eu conseguisse chegar o mais longe possível na realização deste projeto;

Ao Doutor Markus Meissner, Glasgow, por ter disponibilizado a estirpe de *T. gondii* utilizada neste trabalho, RH Ku80 :: diCre.

À Faculdade de Medicina Veterinária e ao CIISA por ter permitido a realização deste trabalho nas suas instalações;

Ao Gonçalo pelo magnífico companheiro de formação. Pelo apoio e auxílio, pela amizade e partilha nos momentos mais difíceis;

À Marta, por me ter dado a conhecer o grupo onde desenvolvi o trabalho. Pela magnífica amiga que demonstrou ser, por ter estado sempre disponível para me ouvir e ajudar nos momentos mais angustiantes, por não me ter deixado desistir;

À Joana, pelo apoio, pela força e amizade incondicional na etapa mais desafiante da minha vida;

Ao António, por me ter feito acreditar na pessoa que sou. Por me ter obrigado a enfrentar as circunstâncias e a lutar pela concretização deste trabalho, pelo magnífico Ser Humano que é, e que admiro;

Aos meus amigos, (BDB's, Monitores, Luís Ramos, Dany, Maria João) pela forma carinhosa com que sempre estiveram a meu lado e que aceitaram a minha ausência. Pela partilha dos meus momentos de glória, mas acima de tudo pelo enorme apoio que me deram;

À minha irmã, por me ter dado a mão num momento tão importante da minha vida, por ter apelado à união num momento tão delicado;

Às Lara e à Letícia, pelas crianças fantásticas que são e por tudo fazerem para que o meu sorriso não desvanecesse;

Ao meu Pai, por na fase mais exigente da sua vida se ter demonstrado um verdadeiro exemplo de luta e de coragem, um verdadeiro Herói que por entre a sua frágil saúde me deu toda a força não me deixando desistir de lutar pelo meu trabalho;

Por último, não poderia deixar de agradecer à minha Mãe. O meu pilar. Uma verdadeira Guerreira, uma mãe extraordinária que assistiu de perto a todo este processo, quem mais sofreu com as minhas angústias e fragilidades e com a minha ausência num momento tão delicado.

Muito obrigado por acreditarem em mim e pela força que me transmitiram na concretização deste trabalho.

Resumo

O protozoário *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório (filo Apicomplexa) que infeta vertebrados. Este parasita constitui uma preocupação séria de segurança sanitária dos alimentos e é um importante agente patogénico oportunista em doentes com SIDA e outros indivíduos imunossuprimidos.

Durante a infeção, a resposta imunitária do hospedeiro induz a conversão deste parasita intracelular da sua forma proliferativa (taquizoítos) para a sua forma latente de quisto (bradizoítos). Os quistos de bradizoíto podem permanecer nos tecidos do hospedeiro durante toda a vida. Quando a imunidade do hospedeiro é atenuada os bradizoítos podem reverter em taquizoítos que replicam ativamente, representando uma infeção crónica.

A proteína Mob1 é uma excelente candidata a participante no controlo da replicação do parasita e consequentemente no estabelecimento da infeção. A Mob1 é essencial na citocinese e no controlo da proliferação celular *versus* apoptose. A Mob1 humana, para além do envolvimento no controlo da proliferação também está envolvida na duplicação do centrossoma.

Resultados obtidos pelo grupo onde me insiro demonstraram que a expressão do gene Mob1 em *T.gondii* diminui durante a replicação do parasita dentro das células hospedeiras, nomeadamente quatro horas após a invasão. Este periodo de tempo corresponde, de facto, ao início da replicação do parasita. Foi ainda criada uma estirpe de *T. gondii* a sobre-expressar Mob1 e analisado o fenótipo replicativo do parasita em resposta à sobre-expressão da Mob1. Os parasitas que sobre-expressavam Mob1 apresentavam um atraso na replicação comparativamente à estirpe selvagem.

Estes resultados suportam a hipótese de que a Mob1 de *T. gondii* está envolvida no controlo da replicação do parasita e do número de parasitas dentro do hospedeiro.

Com este trabalho pretendo construir um “knockout” condicional da Mob1 em *T. gondii* demonstrando qual o papel da proteína na replicação do parasita. Contudo não foi possível concluir, ficando por inserir na construção a 5'UTR e, posteriormente, o cDNA da Mob1.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmose, Mob1, Mob1_KO.

Summary

The protozoan *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite (phylum Apicomplexa) that infects warm-blooded vertebrates. This parasite is a major food security concern and an important life-threatening opportunistic pathogen in AIDS patients and other immunosuppressed individuals.

During the infection, the host immune response induces this intracellular parasite to convert from a proliferating stage (tachyzoite) into a latent tissue cyst stage (bradyzoite). Bradyzoite cysts can remain in the host tissues for life. Bradyzoites can revert to actively replicating tachyzoites when host immunity is attenuated, representing a lifelong chronic infection.

Mob1 protein is an excellent candidate to control parasite replication and consequently it would be crucial for the establishment of the infection process. Mob1 protein is essential for the control of cellular proliferation versus apoptosis. Human MOB1 has been implicated in cell proliferation control and also plays a role in centrosome duplication.

Based in results of the group Mob1 gene expression in *T. gondii* is strongly down-regulated during the parasite replication inside the host cell, namely four hours post infection. Indeed, this period of time corresponds to the beginning of parasite replication cycle. It was also created a *T. gondii* strain over expressing Mob1 and analyzed the parasite replicative phenotype in response to the Mo1 over expression. The parasites over expressing Mob1 show a significant delay in the replication process in comparison to the wild type strain.

These data support our hypothesis that in *T. gondii* Mob1 is involved in the control of parasite replication and number inside the host.

With this work I intend to produce Mob1 conditional knockout in *T. gondii* to demonstrate the Mob1 role in parasite replication, however this was not completed, lacking the 5'UTR introduction in the construction and subsequently the cDNA of Mob1.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis, Mob1, Mob1_KO.

Índice Geral

| | |
|--|----|
| Dedicatória..... | 2 |
| Agradecimentos | 3 |
| Summary | 6 |
| Índice de Figuras | 10 |
| Índice de Tabelas..... | 10 |
| Lista de Siglas | 13 |
| I.1 Características Biológicas de <i>Toxoplasma gondii</i> | 16 |
| I.1.2 Taxonomia | 16 |
| I.1.2 Morfologia e Ciclo de vida..... | 16 |
| I.1.2.1 Morfologia | 16 |
| I.1.2.2 Ciclo de vida | 18 |
| I.1.3 Resposta Imunitária..... | 20 |
| I.1.4 Infeções provocadas por <i>T. gondii</i> | 20 |
| I.1.4.1 Epidemiologia | 20 |
| I.1.4.2 Fatores de risco | 21 |
| I.1.4.3 Diagnóstico | 21 |
| I.2 Controlo da Replicação Celular | 22 |
| I.2.1 Proteína Mob | 23 |
| I.2.1.1 Mob1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 24 |
| I.2.1.2 Mob1 de <i>Saccharomyces pombe</i> | 24 |
| I.2.1.3 Mob1 de células humanas | 25 |
| I.2.1.4 Mob1 de Protozoários..... | 25 |
| I.1 Objetivo..... | 28 |
| II.1 Cultura de células | 30 |
| II.1.1 Estirpes bacterianas e condições de cultura..... | 30 |
| II.1.1.1 Estirpes bacterianas..... | 30 |
| II.1.1.2 Meios e condições de cultura..... | 30 |
| I.1.2.1 Preparação de células <i>E.coli</i> competentes | 30 |
| II.1.1.4. Transformação de células competentes | 31 |
| II.1.2 Células de mamífero e condições de cultura | 31 |
| II.1.2.2 Linhas celulares de mamífero | 31 |
| II.1.2.2 Meios e condições de cultura..... | 31 |
| II.1.3 <i>Toxoplasma gondii</i> e condições de cultura..... | 32 |

| | | |
|---|---|----|
| II.1.3.1 | Estirpes de <i>T. gondii</i> | 32 |
| II.1.3.2 | Meios e condições de cultura..... | 33 |
| II.2 Técnicas utilizadas para a amplificação de DNA recombinante e clonagem molecular | | 33 |
| II.2.1 | Extração de DNA genómico de <i>T. gondii</i> | 33 |
| II.2.2 | Extração de RNA de <i>T. gondii</i> | 34 |
| II.2.3 | Síntese de cDNA..... | 34 |
| II.2.4.2 | PCR..... | 35 |
| II.2.4.2.1 | Amplificação dos fragmentos 5'UTR e 3'UTR do gene da Mob de <i>T. gondii</i> | 35 |
| | Amplificação da região 3'UTR..... | 35 |
| | Amplificação da 5'UTR | 38 |
| II.2.4.2.2 | Amplificação do cDNA da Mob1..... | 39 |
| II.2.5 | Eletroforese de DNA..... | 40 |
| II.2.6 | Extração e purificação de fragmentos de DNA a partir de um gel de agarose | 41 |
| II.2.7 | Sub-clonagem do fragmento 3'UTR no vetor p-GEM T-Easy..... | 41 |
| II.2.7.2 | Ligação..... | 41 |
| II.2.8 | Reação de PCR para testar se as colónias bacterianas são recombinantes – “Colony PCR” | 42 |
| II.2.9 | Confirmação das sequências nucleotídicas por sequenciação automática | 44 |
| II.3 Clonagem dos fragmentos no vetor “knockout” (KO) de <i>T. gondii</i> | | 45 |
| II.3.1 | Hidrólise dos fragmentos e do vetor | 46 |
| | Fragmento 5'UTR | 46 |
| II.3.2 | Hidrólise do cDNA Mob1..... | 47 |
| II.3.3 | Mistura de ligação | 47 |
| | Fragmento 3'UTR | 47 |
| | Fragmento 5'UTR | 48 |
| II.4 Preparação de DNA plasmídico | | 49 |
| II.4.1 | Em pequena escala (“minipreps”) | 49 |
| II.1 | Em média escala (“midipreps”)..... | 49 |
| III.1 Amplificação dos fragmentos 3'UTR e 5'UTR da Mob, a partir de DNA genómico de <i>T. gondii</i> | | 51 |
| III.1.1 | Amplificação da região 3'UTR da Mob de <i>T. gondii</i> | 51 |
| III.1.2 | Amplificação da região 5'UTR..... | 62 |
| III.1.3 | Amplificação do cDNA da Mob1..... | 64 |

| | | |
|----------------|--|----|
| III.2 | Clonagem dos fragmentos no vetor KO de <i>T. gondii</i> | 65 |
| III.2.1 | Clonagem do fragmento 3'UTR no vetor KO | 65 |
| III. | Clonagem do fragmento 5'UTR no vetor | 67 |
| IV. | Discussão dos Resultados | 73 |
| V. | Considerações finais e Perspetivas Futuras | 77 |
| VI. | Referências Bibliográficas | 75 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Representação esquemática da estrutura do taquizoíto..... | 17 |
| Figura 2 - Complexo apical de <i>Toxoplasma gondii</i> | 18 |
| Figura 3 - Ciclo de vida do <i>T. gondii</i> | 19 |
| Figura 4 - <i>T. termophila</i> sem finalização da citocinese, resultado da formação de células anormalmente gigantes com a incorreta orientação do eixo de polaridade ... | 26 |
| Figura 5 - Resultados PCR em tempo real para análise da expressão de <i>mob1</i> em <i>T. gondii</i> após invasão celular..... | 27 |
| Figura 6 – Esquema da rampa de temperaturas utilizada para obter a região 3'UTR por PCR..... | 37 |
| Figura 7 - Esquema do teste das colónias bacterianas..... | 42 |
| Figura 8 - Construção KO <i>Mob1</i> | 45 |
| Figura 9 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR.... | 51 |
| Figura 10 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR.. | 52 |
| Figura 11 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR após hidrólise do DNA genómico com o enzima <i>BamHI</i> | 52 |
| Figura 12 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR a diferentes temperaturas de hibridação dos “primers” | 53 |
| Figura 13 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR após hidrólise do DNA genómico com o enzima <i>BamHI</i> | 54 |
| Figura 14 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR após hidrólise do DNA genómico com oenzima <i>BamHI</i> | 54 |
| Figura 15 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR após hidrólise do DNA genómico com o enzima <i>BamHI</i> | 55 |
| Figura 16 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR a diferentes temperaturas de hibridação dos “primers” | 56 |
| Figura 17 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR após hidrólise do DNA genómico com o enzima <i>BamHI</i> | 56 |
| Figura 18 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR após hidrólise do DNA genómico com o enzima <i>BamHI</i> | 57 |
| Figura 19 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR após hidrólise do DNA genómico com o enzima <i>BamHI</i> | 58 |
| Figura 20 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR após hidrólise do DNA genómico com o enzima <i>BamHI</i> | 58 |
| Figura 21 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR, com os novos pares de “primers” a diferentes temperaturas de hibridação..... | 59 |
| Figura 22 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR após hidrólise do DNA genómico com o enzima <i>BamHI</i> | 60 |
| Figura 23 - Análise eletroforética dos resultados obtidos por “Colony PCR” referente à clonagem da 3'UTR no vetor p – GEM T-Easy | 61 |
| Figura 24 - Análise eletroforética da amplificação da região 3'UTR, a partir do vetor p-GEM T-Easy, com os “primers” contendo os locais de restrição | 62 |
| Figura 25 - Análise eletroforética das reações de PCR para a amplificação da região 5'UTR, utilizando um gradiente de temperaturas | 63 |

| | |
|---|----|
| Figura 26 - Análise eletroforética das reações de PCR para a amplificação da região 5'UTR, a 59°C | 63 |
| Figura 27 - Análise eletroforética das reações de amplificação do cDNA da Mob1 | 64 |
| Figura 28 - Análise eletroforética das reações do “Colony PCR”, para a identificação do fragmento 3'UTR no vetor | 65 |
| Figura 29 - Análise eletroforética da hidrólise do DNA plasmídico de uma colónia do vetor KO com a 3'UTR clonada. | 66 |
| Figura 30 - Análise eletroforética para observação do produto de hidrólise do vetor KO com a 3'UTR das 3 colónias selecionadas com o enzima <i>SacI</i> | 67 |
| Figura 31 - Análise eletroforética das reações do “Colony PCR”, para a identificação do fragmento 5'UTR no vetor | 68 |
| Figura 32 - Análise eletroforética para observação do produto de hidrólise do vetor KO com a 3'UTR das 3 colónias selecionadas com os enzimas <i>NotI</i> e <i>MfeI</i> | 68 |
| Figura 33 - Análise eletroforética para observação do produto de hidrólise do vetor KO com a 3'UTR das 3 colónias selecionadas com os enzimas <i>BamHI</i> e <i>SpeI</i> | 69 |
| Figura 34 - Análise eletroforética para observação do produto de hidrólise do vetor KO com a 3'UTR das 3 colónias selecionadas com os enzimas <i>BamHI</i> e <i>SpeI</i> | 70 |
| Figura 35 - Análise eletroforética para observação do produto de hidrólise do vetor KO com a 3'UTR e do vetor <i>pIC113</i> com os enzimas <i>BamHI</i> e <i>SpeI</i> | 71 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - “Primers” desenhados para amplificar o fragmento 3’UTR..... | 36 |
| Tabela 2 - Mistura de reação de PCR para amplificar a região 3’ UTR..... | 37 |
| Tabela 3 - Condições da reação de PCR..... | 38 |
| Tabela 4 - Primers desenhados para amplificar o fragmento 5’UTR | 38 |
| Tabela 5 - Condições da reação de PCR..... | 39 |
| Tabela 6 - Primers desenhados para amplificar o cDNA da Mob1 | 39 |
| Tabela 7 - Condições da reação de PCR..... | 40 |
| Tabela 8 - “Primers” desenhados para testar as colónias..... | 43 |
| Tabela 9 - Condições da reação de PCR..... | 43 |

Lista de Siglas

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

“Desoxiribonucleic Acid”

cDNA - Ácido Desoxirribonucleico Codificante

DMSO - Sulfóxido de Dimetilo

“Dimethyl Sulfoxide”

dNTPs - Desoxirribonucleótidos Trifosfato

“Deoxynucleotide Triphosphates”

IMC - Complexo Membranar Interno

“Inner Membranar Complex”

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

“Ethylenediamine Tetraacetic Acid”

Mob1 - “Mps One Binder Protein”

mRNA - Ácido Ribonucleico Mensageiro

MT - Microtúbulos subpeliculares

ng/μl - Nanogramas por microlitro

OA - Aparelho Oral

PBS - Tampão fosfato-salino

“Phosphate Buffered Saline”

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

“Polimerase Chain Reaction”

RNA - Ácido ribonucleico

“Ribonucleic Acid”

T. gondii - Toxoplasma gondii

3' UTR - Região não codificante 3'

“ Untranslated Region 3' ”

5' UTR - Região não codificante 5'

“ Untranslated Region 5' ”

Capítulo I

Introdução

I.1 Características Biológicas de *Toxoplasma gondii*

O protozoário *Toxoplasma gondii* é uma parasita intracelular obrigatório que infeta vertebrados, constituindo uma preocupação séria de segurança sanitária dos alimentos.

I.1.2 Taxonomia

Segundo descrito por Levine *et al.* (1980), a espécie *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1908), pertence ao reino Protista (Haeckel, 1866); sub-reino *Protozoa* (Golffuss, 1918 e Von Siebold, 1845); filo Apicomplexa (Levine, 1970); classe *Sporozoa* (Leukart, 1879); ordem *Eucocidia* (Léger e Duboscq, 1910); sub-ordem *Eimeriina* (Léger, 1911); família *Sarcocystidae* (Poche, 1913); sub-família *Toxoplasmatinae* (Biocca, 1956) e género *Toxoplasma*.

I.1.2 Morfologia e Ciclo de vida

I.1.2.1 Morfologia

O protozoário *T. gondii* possui um complexo apical completo do qual fazem parte o corpo conóide que define a extremidade apical, o anel apical a partir do qual se projetam os microtúbulos sub-peliculares, um par de microtúbulos central que atravessa o anel apical e ainda organelas secretoras especializadas como as róptrias e micronemas, que auxiliam no processo de invasão e adesão celular respetivamente (Figura 1 e 2).

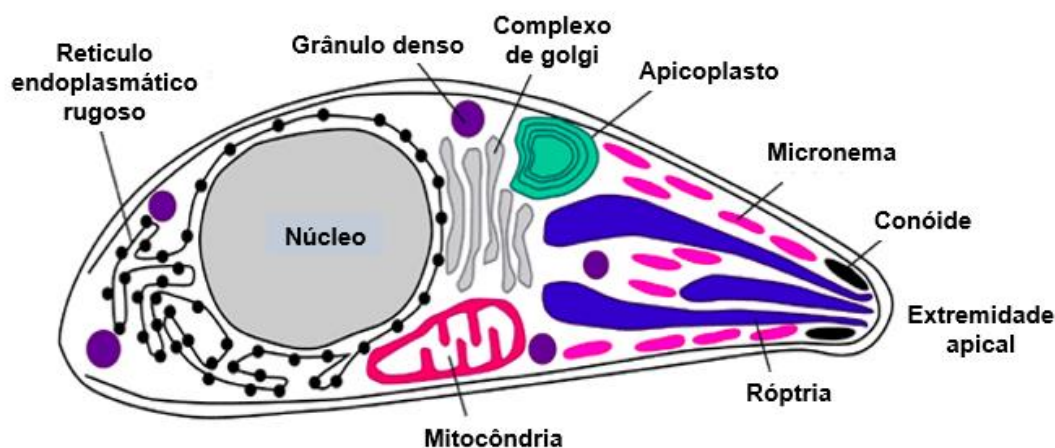


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura do taquizoíta, adaptado de Ajioka, JW. *et al.*, 2001

O *T. gondii* tem quatro diferentes formas infetantes, quer para os hospedeiros intermediários (por exemplo o Homem) quer para os hospedeiros definitivos (membros da família *Felidae*), os taquizoítos, os bradizoítos, os merozoítos e os esporozoítos. Os taquizoítos e os merozoítos são responsáveis pela expansão da população de parasitas na célula hospedeira, os bradizoítos e os esporozoítos são capazes de infetar novos hospedeiros através do ambiente (Hu et al., 2002).

Todas as formas infetantes possuem a mesma morfologia, com apenas pequenas variações entre elas.

Os taquizoítos são a forma infetante de *T. gondii* mais estudada, constituem a forma de proliferação rápida do parasita. Requerem um habitat intracelular para conseguirem sobreviver, formam rosetas que acabam por provocar a lise das células hospedeiras, e multiplicam-se libertando taquizoítos para novas invasões (Gross. U., et al, 1996).

Os ooquistos, com esporozoítos no seu interior, podem ser encontrados na água ou em alimentos que se encontrem contaminados. Cada ooquisto possui 2 esporozoítos com 4 esporozoítos cada. Esta forma de resistência do parasita *T. gondii* possui uma elevada resistência ambiental, podendo permanecer viável no solo durante meses (Montoya e Lisenfeld, 2004).

Os bradizoítos, morfologicamente semelhantes aos taquizoítos, firmam-se como forma de proliferação lenta. Os quistos, que poderão conter milhares de bradizoítos no seu interior, localizam-se de forma preferencial ao nível do cérebro, músculo cardíaco

e esquelético. Quando a imunidade do hospedeiro se encontra comprometida, os bradizoítos convertem a taquizoítos e causam uma re-infecção (Montoya e Lisenfeld, 2004).

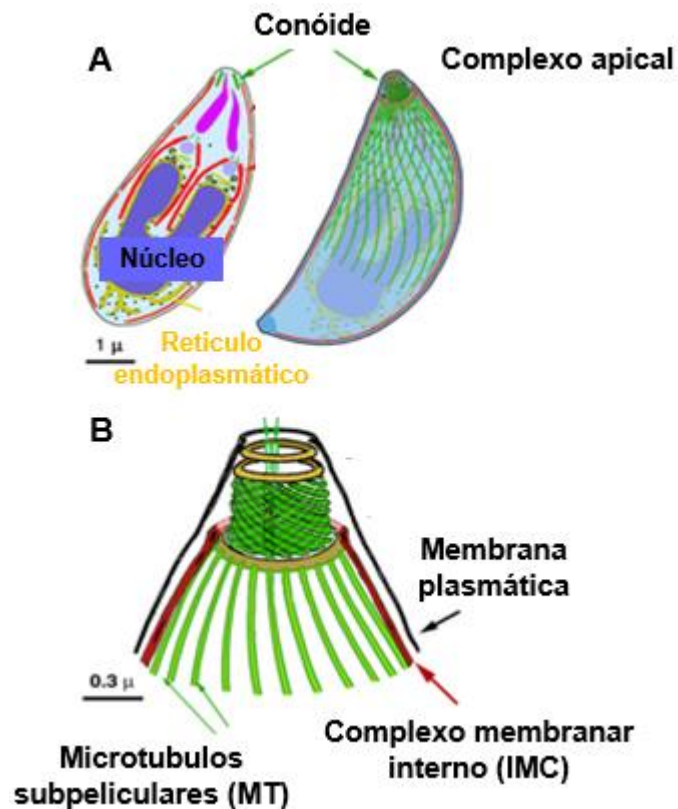


Figura 2 - Complexo apical de *Toxoplasma gondii*. (A) Esquema global do *T. gondii*; (B) Esquema do complexo apical em detalhe, adaptado de Ke Hu *et al.*, 2006

Os estádios de infecção correspondentes aos taquizoítos, bradizoítos, esporozoítos e merozoítos diferem entre si no número de organelas, da forma e densidade das róptrias, da localização do núcleo e da presença ou ausência de grânulos polissacáridos (Coppin *et al.*, 2005). As diferenças mais evidentes são ao nível das organelas localizadas na zona apical do parasita (Dubey *et al.*, 1998).

I.1.2.2 Ciclo de vida

Para além de infetar mamíferos incluindo os seres humanos, o *T. gondii* tem a capacidade de infetar também outros animais (Tenter, *et al.*, 2000; Dubey., 2004).

O *T. gondii* apresenta um ciclo de vida complexo, até à data os únicos hospedeiros definitivos conhecidos, do *T. gondii* são os membros da família *Felidae* (maioritariamente gatos), e é através das fezes dos hospedeiros definitivos que os ooquistos não esporulados são excretados para o meio ambiente (Dubey et al., 1998). Normalmente os ooquistos levam 1-2 semanas a serem libertados, sendo a grande maioria dos quistos excretada e ao fim de 1-5 dias ocorre a esporulação, onde os quistos se tornam infecciosos (fase sexuada do ciclo) (Dubey et al., 1998).

Os hospedeiros intermediários (aves, roedores, etc,...) podem ficar infetados após a ingestão água ou alimentos contaminados com ooquistos e, após a ingestão, os ooquistos converter-se-ão em taquizoítos que irão alojar-se no tecido neuronal e muscular, onde irão formar o vacúolo parasitóforo e camuflar-se do sistema imunitário, desenvolvendo-se posteriormente em bradizoítos (fase assexuada do ciclo) (Figura 3).

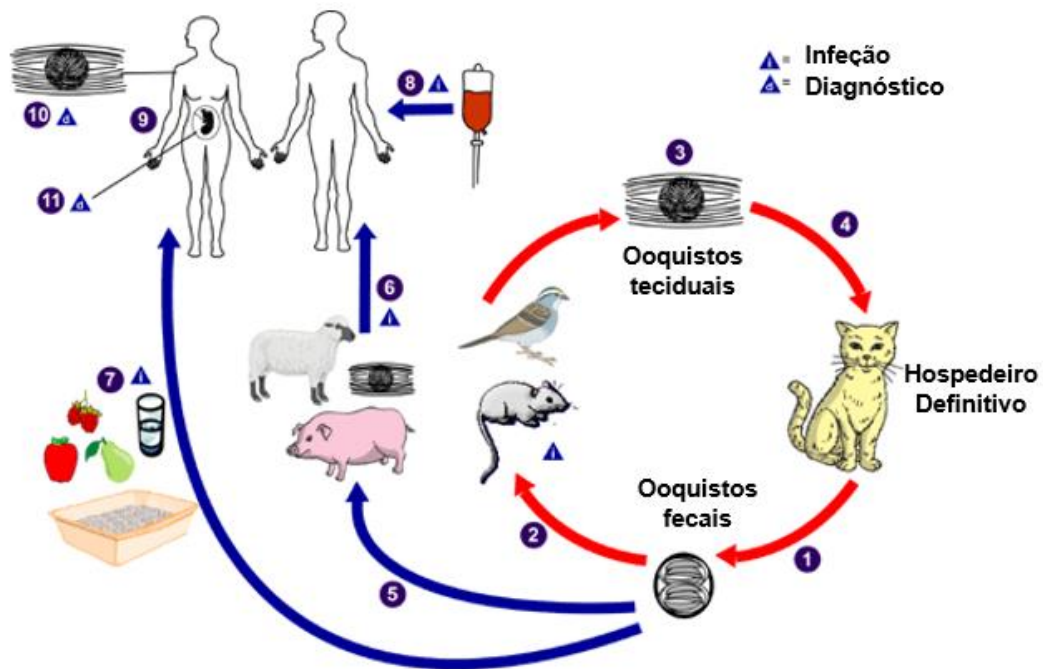


Figura 3 - Ciclo de vida do *T. gondii*, adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.

Os gatos (hospedeiros definitivos) ficam infetados depois de se terem alimentado de aves e roedores que se encontravam infetados. Podem ainda ficar infetados através da ingestão direta de ooquistos esporulados.

Relativamente ao Homem, pode ser infetado através de diferentes vias entre as quais se realça a ingestão de carne mal cozinhada de animais portadores de quistos teciduais, o consumo de alimentos ou água contaminados com fezes de gato ou amostras ambientais que se encontrem contaminadas, transfusões de sangue ou transplante de órgãos e ainda via transplacentária, da mãe para o feto. No Homem, os parasitas formam quistos teciduais mais frequentemente no músculo-esquelético, miocárdio, cérebro e olhos, onde podem permanecer durante toda a vida do hospedeiro.

I.1.3 Resposta Imunitária

Os mecanismos de defesa do hospedeiro desempenham um papel fundamental no controlo da atividade do *T. gondii*.

A resposta imunológica específica acaba por inibir de forma eficiente a replicação do parasita contudo, não é capaz de o destruir.

Este parasita possui mecanismos de escape do sistema imunitário, apresentando uma reduzida imunogenicidade sob a forma de quistos teciduais, que se mantêm viáveis ao longo da vida do hospedeiro.

I.1.4 Infecções provocadas por *T. gondii*

I.1.4.1 Epidemiologia

A toxoplasmose, possui uma ampla distribuição geográfica com casos descritos em todos os continentes, estimando-se que mais de um terço da população mundial se encontre infetada cronicamente (Montoya et al., 2004).

Como referido anteriormente, tanto o Homem como os animais podem ser infetados pelo *T. gondii* através da ingestão de alimentos crus ou água, contaminados.

Os taquizoítos de *T. gondii* desempenham um papel fundamental na transmissão vertical e, uma menor influência, na transmissão horizontal uma vez que apresentam elevada sensibilidade ao meio ambiente sendo por isso inativados quando se encontram fora do hospedeiro. Assim, conforme descrito por Tenter (2000), a infecção transmitida sob a forma de taquizoítos através da alimentação parece não representar grande impacto epidemiologicamente.

I.1.4.2 Fatores de risco

A toxoplasmose é considerada uma doença alimentar, uma vez que a principal fonte de contaminação é via infecção oral. Contudo não deixam de ser relevantes outras vias de transmissão, como referido anteriormente, atribuindo destaque à transmissão transplacentária, transfusões de sangue e ainda transplante de órgãos.

Têm sido realizados estudos com o objetivo de identificar fatores de exposição que representem risco de infecção por *T. gondii*. Foram formados grupos de doentes infetados e identificados. Havia um grupo formado por crianças, outro em que os doentes eram adultos com imunidade recente ou mais antiga, outro constituído por indivíduos imunocomprometidos, outro por grávidas que apresentavam imunidade ou grávidas infetadas recentemente, outro por grávidas com seroconversão durante a gestação ou mães de recém-nascidos com infecção congénita por *T. gondii*, definindo assim que fatores como indivíduos imunocomprometidos ou grávidas, por exemplo, constituem parâmetros de elevado risco de infecção por *T. gondii* (Remington JS. *et al.*, 2004).

I.1.4.3 Diagnóstico

O diagnóstico de toxoplasmose começou por ser feito com a realização do teste de “Sabin-Feldman”. Sabin e Feldman desenvolveram um teste serológico, com capacidade de identificar infecções provocadas por *T. gondii* e ainda de fazer o diagnóstico diferencial de outras patologias que partilhem a mesma sintomatologia que a toxoplasmose (Sabin and Feldman, 1949).

Mais tarde, Remington e colaboradores propuseram a detecção de anticorpos IgM no sangue do cordão umbilical para o diagnóstico de toxoplasmose congênita. Apesar de algumas limitações, este teste mostrou-se bastante útil para programas de rastreio (Remington *et al.*, 2001).

Contudo uma das técnicas que tem demonstrado ser bastante útil no diagnóstico de toxoplasmose é a detecção de DNA de *T. gondii* através da técnica de PCR. Em 1989, Burg e colaboradores reportaram a primeira detecção de DNA de *T. gondii* a partir de um único taquizoíto, através da amplificação do gene B1. Com o desenvolvimento de novos estudos, foram definidos novos genes alvo para o diagnóstico desta infecção (Remington *et al.*, 2011).

I.2 Controle da Replicação Celular

O conhecimento dos mecanismos moleculares associados ao controle da replicação dos parasitas, e o número de parasitas na célula hospedeira, poderá ser a chave para a pesquisa de novos alvos moleculares e desenvolvimento de novas terapias.

O processo de divisão celular, bem como a eficácia da mesma, é fundamental para a manutenção da ploidia das células e estabilidade genética. Eventos como a replicação do DNA, a segregação dos cromossomas, a finalização da mitose e a citocinese têm de ser rigorosamente controlados de forma a manter a homeostasia dos organismos (Kops e Cleveland, 2007).

A “Mitotic Exit Network” (MEN) é uma cascata de sinalização, descrita em leveduras, que controla a mitose até à transição da fase M para G1. No final da via MEN ocorre a ativação da Cdc14, uma Cdk (cinase dependente de ciclina), que promove a degradação das ciclinas, um evento crucial para a saída de mitose e citocinese em todos os organismos eucariotas. A ativação da Cdc14 é dependente da atividade cinase do complexo Mob1 / Dbf2 (Bardin e Amon, 2001). A Mob1 interage com a proteína Dbf2, uma cinase necessária para a correta progressão através da mitose, mais especificamente durante a telofase. Esta associação física entre Mob1 e Dbf2, juntamente com os níveis de expressão semelhantes durante o ciclo celular,

sugerem que estas proteínas possam cooperar na regulação da fase final da mitose, ou seja, que a proteína Dbf2 se encontre envolvida na regulação de um passo crucial da telofase com o auxílio da Mob1 (Komarnitsky *et al.*, 1998).

Muitas das proteínas envolvidas na MEN são conservadas em eucariotos superiores. Ortólogos das cinases envolvidas na via MEN têm sido caracterizados em mamíferos e em *Drosophila*, fazendo parte de uma cascata de fosforilação conservada conhecida como “Hippo pathway”. Esta via está descrita como crucial para o controlo da proliferação celular *versus* apoptose, controlando o tamanho dos órgãos e o desenvolvimento de cancro (Zeng e Hong, 2008; Hergovich *et al.*, 2009).

Nos mamíferos sempre que esta via está ativa, durante a proliferação celular, as cinases da via “Hippo” regulam negativamente a actividade da YAP (“Yes Associated Protein”), por fosforilação, impedindo a sua localização no núcleo da célula. Contudo, se não ocorrer a fosforilação da YAP, esta irá localizar-se no núcleo e exercer a sua actividade como ativador de fatores de transcrição específicos, promovendo a expressão de genes pró-mitóticos (Zeng e Hong, 2008).

Com os dados apresentados, parece claro o envolvimento quer da via “MEN” quer da via “Hippo” no controlo da proliferação celular, sendo os seus componentes excelentes alvos para a regulação do controlo do ciclo celular.

I.2.1 Proteína Mob

As proteínas da família Mob pertencem a uma pequena família de proteínas não catalíticas altamente conservadas nos Eucariotas (Luca & Winey, 1998 e Hergovich, 2011). Estas proteínas partilham várias sequências bastante semelhantes e são características por possuírem um domínio Mob conservado com cerca de 180 resíduos de aminoácidos. O facto de estas proteínas se encontrarem conservadas sugere que desempenhem funções ao nível do estabelecimento e manutenção de características-chave dos Eucariotas durante a sua evolução (Ye *et al.*, 2009).

Estas proteínas não catalíticas expandiram-se ao longo da evolução. Partiram de 2 proteínas, identificadas em *Saccharomyces cerevisiae* (Mob1p e Mob2p), para 4 proteínas Mob em *Drosophila melanogaster* (dMob1 a 4) e para 7 em células humanas (hMOB1A / 1B, hMOB2A / 2B / 2C, hMOB3 e hMOB4) (Chow *et al.*, 2010).

Apesar de estarem identificados inúmeros membros da superfamília Mob, a função desempenhada pela grande maioria destes genes continua por esclarecer.

I.2.1.1 Mob1 de *Saccharomyces cerevisiae*

A proteína Mob1 (*Mps One Binder*) foi a primeira proteína pertencente a esta família identificada na levedura *S. cerevisiae*, por Luca & Winey em 1998. A sua identificação foi feita num rastreio de proteínas que interagissem com a cinase Mps1, uma proteína essencial para a duplicação do SPB (*spindle pole body*) e para a regulação do fuso mitótico, estudo feito através do sistema de dois híbridos em leveduras. Apesar da interação verificada entre estas duas proteínas, a proteína Mob1 parece não ser necessária em qualquer uma das funções descritas, apesar de ser necessária para a conclusão da mitose e para a manutenção da ploidia (Luca & Winey, 1998).

I.2.1.2 Mob1 de *Saccharomyces pombe*

Na levedura *S. pombe* existe um gene Mob1 homólogo ao de *S. cerevisiae*, também ele envolvido no controlo da saída de mitose. Este gene foi identificado em simultâneo por dois grupos diferentes que utilizaram diferentes abordagens experimentais (Hou et al., 2000).

Tal como em *S. cerevisiae*, a Mob1 de *S. pombe* também tem um papel fundamental. Células em que o gene foi deletado apresentam um fenótipo típico dos mutantes na rede de sinalização da septação, uma vez que não conseguem formar o septo e não completam a citocinese, conduzindo à formação de células multinucleadas (Salimova et al., 2000; Hou et al., 2000).

Como os mutantes Mob1 de *S. pombe* não evidenciam qualquer defeito no final da mitose e apenas são requeridos para a citocinese é possível que, ao contrário do que acontece em *S. cerevisiae*, onde este gene está descrito como estando envolvido na regulação de vários eventos na fase final da mitose, a principal função da Mob1 em *S. pombe* seja o controlo da septação através da via SIN (Salimova et al., 2000; Hou et al., 2000).

I.2.1.3 Mob1 de células humanas

Em células humanas estão identificados 7 genes do tipo MOB1 - hsMOB1, hsMOB2, hsMOB3A/3B/3C e hsMOB4A/4B. Após análise dos produtos de expressão destes genes, o que se encontrava com os níveis mais próximos da Mob1 de levedura é a hsMob4 (com cerca de 43% de identidade).

Um estudo da análise dos padrões de expressão dos mRNAs dos hsMobs em diferentes tecidos humanos revelou que há uma expressão seletiva de cada uma destas proteínas. O hsMob4A e o hsMob4B possuem 95% de identidade mas diferentes padrões de expressão em tecidos humanos. Para além disso alguns dos tecidos expressam apenas uma das proteínas hsMob, como é o caso da traqueia e dos rins que apenas expressam hsMob3B e hsMob2, respetivamente (Chow *et al.*, 2010).

I.2.1.4 Mob1 de Protozoários

Existem poucos estudos da Mob1 em Protozoários, em *Trypanosoma brucei* os parasitas com a proteína depletada apresentam falhas na citocinese (Hammarton *et al.*, 2005).

O estudo desta proteína em protozoários é de grande interesse e relevância, as mais recentes descobertas evidenciam a existência de marcadores de morte celular em parasitas livres (Kaczanowski *et al.*, 2011). Estas moléculas parecem desempenhar um papel importante na regulação da proliferação do parasita durante a infeção. Para permitir a infeção e a transmissão para um novo hospedeiro, os parasitas devem evitar o crescimento excessivo, uma vez que o seu crescimento descontrolado no interior da célula hospedeira pode conduzir não só à morte do hospedeiro como à morte do próprio parasita (Luder *et al.*, 2010). Assim, o parasita parece desempenhar um papel fundamental na regulação do número de parasitas, não sendo este número apenas uma consequência dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

O protozoário *Tetrahymena thermophila* possui um gene Mob descrito como sendo fator essencial para o estabelecimento do eixo de divisão e, conseqüentemente, pela correta orientação do plano de divisão celular para a ocorrência da citocinese (Tavares, A., *et al.* 2012). No mesmo estudo, verificou-se que a diminuição de Mob1 nas células de *T. thermophila* ("Mob1-KD"), causa alterações consideráveis na

orientação do plano de divisão da célula. Nestas células a citocinese não é concluída, no entanto continuam a tentar dividir-se originando células anormalmente grandes, que não finalizaram a divisão (figura 4), com a incorreta orientação do eixo de polaridade (Tavares, A., *et al.*, 2011).

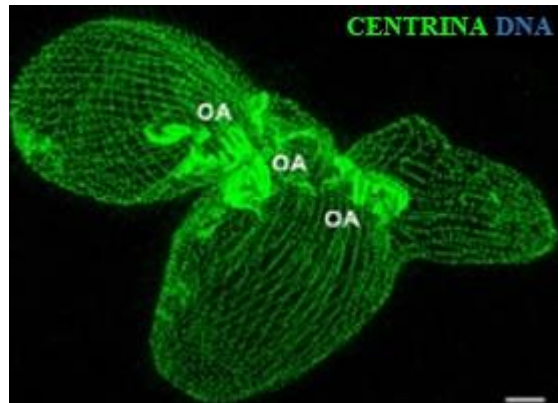


Figura 4 - *T. termophila* sem finalização da citocinese, resultado da formação de células anormalmente gigantes com a incorreta orientação do eixo de polaridade (OA – Aparelho Oral), adaptado de Tavares, A. *et al.*, 2011.

O nosso grupo de investigação tem particular interesse em estudar os mecanismos moleculares envolvidos na invasão e replicação de *T. gondii*. Este parasita é um excelente modelo biológico, apresentando inúmeras ferramentas moleculares disponíveis para a manipulação genética. O *T. gondii* apresenta apenas um gene que codifica para a proteína Mob1. Estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de investigação, resultados não publicados, suportam a hipótese de que a proteína Mob1 poderá estar envolvida na regulação da replicação. Nestes estudos observou-se a diminuição da expressão de *mob1* no interior da célula hospedeira, nomeadamente 4 horas após a invasão do parasita (figura 5). De facto, 4 horas após invasão, momento em que os parasitas começam a replicar, os níveis de expressão de *mob1* são quase vestigiais em comparação com o número de parasitas livres (controlo), sendo estes valores mantidos até pelo menos 24 horas após a entrada na célula hospedeira. Estes resultados suportam fortemente a hipótese de que a Mob1 de *T. gondii* está envolvida no controlo da replicação, uma vez que para que ocorra a replicação, pelo menos ao nível de mRNA, a expressão da *mob1* diminui.



Figura 5 - Resultados PCR em tempo real para análise da expressão de mob1 em *T. gondii* após invasão celular (Resultados não publicados de Tavares, A. *et al*, 2013).

De seguida foi criada uma estirpe de *T.gondii* a sobre expressar a mob1 e foi avaliada a capacidade do parasita proliferar no interior da célula hospedeira. Suportando o envolvimento de Mob1 no controle da proliferação de *T. gondii*, observou-se que em sobre expressão de Mob1 os parasitas apresentam um atraso significativo na sua capacidade de replicação.

Estes resultados vieram sustentar a hipótese de que a Mob1 de *T. gondii* estará envolvida no controlo da replicação do parasita, bem como no controlo do número de parasitas dentro do hospedeiro.

Proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, proliferação e morte celular são excelentes candidatas a reguladoras do número de células quer em organismos multicelulares quer em organismos unicelulares, nomeadamente em parasitas protozoários. Assim sendo, e uma vez que as proteínas Mob estão envolvidas quer na regulação, quer na proliferação e morte celular, estas podem ser alvos ideais para combater parasitas protozoários.

I.1 Objetivo

Com a realização deste trabalho, pretende-se prosseguir com o estudo do papel da proteína Mob1 na replicação de *T. gondii* através da construção de “knockout” condicional no parasita.

Este trabalho teve por objetivo obter a construção genómica necessária à futura produção de um KO condicional. Desta forma foi necessário sintetizar o cDNA da Mob1 bem como os braços de homologia a partir de DNA genómico do parasita. Estes fragmentos serão posteriormente clonados no vetor KO.

Após a construção “Mob1Tg_Ko” o objetivo será transfetar *T. gondii* por eletroporação.

Capítulo II
Materiais e métodos

II.1 Cultura de células

II.1.1 Estirpes bacterianas e condições de cultura

II.1.1.1 Estirpes bacterianas

Para a realização deste trabalho foi utilizada a estirpe de *Escherichia coli* TOP10 (ATCC™ “American Type Culture Collection”) para a amplificação de DNA plasmídico.

II.1.1.2 Meios e condições de cultura

A cultura bacteriana foi feita em meio de cultura líquido Luria Broth (LB) (NZYtech), quando necessário suplementado com o antibiótico adequado (ampicilina à concentração final de 100 µg/ml), a 37°C, com agitação. Para uma conservação durante um maior período de tempo, as células foram congeladas em meio LB suplementado com glicerol (20%) a -80°C.

Para as culturas bacterianas em meio LB sólido (NZYtech), a cada 250ml de meio LB com agar adicionou-se 250µl de ampicilina a uma concentração de 100 mg/ml.

I.1.2.1 Preparação de células *E.coli* competentes

Para poderem ser transformadas com plasmídeos de DNA, as células *E.coli* precisam estar competentes. Para tal, foi feita uma pré-cultura no dia anterior, com 50 ml de meio, sem antibiótico, o qual foi inoculado com uma “ponta estéril” com a qual se “picou” o “stock” de células em glicerol. No dia seguinte, lançou-se uma nova cultura (cerca de 300 ml) com aproximadamente 0,0750 de densidade ótica (600nm) a partir da pré-cultura (para atingir esta densidade ótica faz-se uma diluição de aproximadamente 1/100, ou seja, 3ml inóculo em 300 ml de meio), controlou-se o crescimento até atingir os 0,3 de densidade ótica a 600nm. Centrifugou-se a cultura a 4.500 x g a 4°C durante 2 minutos, descartou-se o sobrenadante e lavou-se as células com MgCl₂ 0.1M (½ do volume inicial da cultura, 150ml). Ressuspendeu-se o precipitado e repetiu-se a centrifugação a 4.500 x g a 4°C durante 2 minutos, descartou-

se o sobrenadante e fez-se uma lavagem das células com CaCl_2 0.1M ($\frac{1}{2}$ do volume inicial da cultura, 150ml) e incubou-se no gelo durante 20 minutos. Efetuou-se nova centrifugação a 4.500 x g, a 4°C durante 2 minutos, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células com CaCl_2 0.1M/Glicerol 15% (1/50 do volume inicial da cultura, 6ml).

Fizeram-se alíquotas de utilização única, 100µl de células competentes em tubos de 1.5 ml, colocou-se no gelo e armazenou-se a -80°C.

II.1.1.4. Transformação de células competentes

Para cada transformação foram usados 100 µl de células competentes, às quais se adicionou o DNA plasmídico ou mistura de reação de ligação, e se incubou no gelo durante 20 minutos. Após os 20 minutos, as células foram submetidas a um choque térmico durante 90 segundos a 42°C e 2 minutos no gelo. Após esta incubação adicionou-se às células 600 µl de meio de cultura (LB líquido sem antibiótico) e incubou-se 37°C, durante 30-60 minutos com agitação. Após esta incubação as células foram centrifugadas a 4500 x g durante 1 minuto, desprezou-se o sobrenadante e o sedimento de células foi ressuspendido em aproximadamente 100 µl de LB e plaqueado em meio sólido suplementado com ampicilina.

II.1.2 Células de mamífero e condições de cultura

II.1.2.2 Linhas celulares de mamífero

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 2 linhas celulares: HFF (fibroblastos humanos provenientes de prepúcio) e Vero (células epiteliais provenientes do rim de macaco verde africano, *Cercopithecus aethiops*).

II.1.2.2 Meios e condições de cultura

As linhas celulares foram mantidas numa estufa a 37°C, em atmosfera húmida com 5% de CO_2 , em frascos de cultura de células de 25cm² (T25) com meio de cultura

DMEM (de “Dulbecco’s modified Eagle’s medium”) com glutamax, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen).

As células foram mantidas em culturas subconfluentes. Imediatamente antes de atingirem a confluência total, as células foram lavadas com PBS e tratadas com tripsina (Invitrogen) de forma a se destacarem da placa de cultura através da quebra das ligações peptídicas entre as células e a superfície da placa. Após o tratamento com tripsina, as células foram diluídas em meio de cultura, o fator de diluição determina o tempo que as células demorarão a estar novamente confluentes, por exemplo, para um intervalo de 2 dias (de sexta para segunda-feira) usa-se uma proporção de 1:3 de células HFF e 1:8 de células Vero. Nas células HFF, este procedimento não ultrapassou as 25 passagens seguidas. Já nas células Vero, uma vez que são células cancerígenas, de proliferação contínua, o mesmo procedimento pode repetir-se indefinidamente, no entanto nunca deixámos passar as 30 passagens para minimizar a acumulação de erros no DNA. Após ser atingido este número de passagens foram descongeladas novas células a partir do “stock” mantido em azoto líquido.

O “stock” de células consiste no armazenamento das mesmas em azoto líquido, tendo sido o meio de congelação composto por DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (criopreservante). As células são colocadas num recipiente apropriado, onde a temperatura diminui de forma gradual (1°C/minuto). Esse recipiente encontra-se à temperatura ambiente e é colocado a -80°C durante a noite e no dia seguinte as células são transferidas para o azoto líquido.

Relativamente ao processo de descongelação das células, este deve ser feito o mais rapidamente possível para que o DMSO, que para além de criopreservante é citotóxico, seja rapidamente diluído no meio de cultura.

II.1.3 *Toxoplasma gondii* e condições de cultura

II.1.3.1 Estirpes de *T. gondii*

A estirpe de *T. gondii* utilizada neste trabalho foi a RH Ku80 :: *diCre*. Esta estirpe foi criada para favorecer a recombinação homóloga em vez da integração ao

acaso, na construção das estirpes “knockout” (KO). Esta estirpe permite a criação de KOs condicionais uma vez que produz uma cre recombinase dimérica cuja atividade é dependente da adição de rapamicina.

II.1.3.2 Meios e condições de cultura

Como o *T. gondii* é um parasita intracelular obrigatório, para a sua manutenção é fundamental a existência de linhas celulares preparadas para serem infetadas.

A partir de um frasco T25 com parasitas que tenham lisado a totalidade das células, transfere-se 1µl para um novo frasco T25 de células HFF confluentes com 4 ml de meio de cultura. Este processo repete-se sempre que as células estiverem totalmente lisadas, com 1µl de inóculo este processo demora aproximadamente 1 semana. Variando a quantidade de inóculo inicial podemos manipular o tempo que os parasitas demoram a lisar todas as células, quanto maior o inóculo menor será o tempo.

II.2 Técnicas utilizadas para a amplificação de DNA recombinante e clonagem molecular

II.2.1 Extração de DNA genómico de *T. gondii*

Para a extração de DNA genómico de *T. gondii*, recolheu-se por centrifugação (10 minutos a 800 x g) os parasitas presentes no meio de cultura de um T25 após lise total das células. Desprezou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se os parasitas em 5 ml de PBS 1X (Invitrogen) e efetuou-se nova centrifugação nas mesmas condições. A partir do precipitado obtido, procedeu-se à extração de DNA genómico com a utilização do kit DNeasy® Blood & Tissue kit (50) (QIAGEN), de acordo com as recomendações do fabricante.

II.2.2 Extração de RNA de *T. gondii*

Para a extração de RNA, recolheu-se por centrifugação (10 minutos a 800 x g) os parasitas presentes num frasco T25 após lise total das células. De seguida, efetuou-se 2 lavagens com PBS 1X (5ml) utilizando o mesmo procedimento do ponto II.2.1. A partir do precipitado obtido procedeu-se à extração de RNA utilizando o kit BioTeq (VWR), de acordo com as recomendações do fabricante.

II.2.3 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o RNA extraído no ponto II.2.2.

Este procedimento deve ser efetuado no gelo e com pontas estéreis.

A um tubo de 0,2 ml foram adicionados 8µl de RNA, 1µl de tampão DNase 10x, 1µl de DNase AmpGrade e incubou-se 30 minutos a 37°C (para remover contaminação com DNA genómico). Após a incubação, para que ocorresse a inativação da DNase, adicionou-se 1µl de EDTA (25mM) e incubou-se a reação durante 10 minutos a 65°C no termociclador. À reação anterior adicionou-se 1µl de Oligo dt (uma pequena sequência de nucleótidos desoxi-timina, que emparelha com a cauda poliA e que irá permitir a síntese da cadeia de DNA complementar, através da ação de transcriptase reversa), 1µl de H₂O livre de RNases, 1µl de dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato, 10mM) e incubou-se durante 5 minutos a 65°C no termociclador e colocou-se no gelo.

Para a síntese de cDNA, adicionou-se à reação 4µl de Tampão SuperScript III (5X), 1µl de Ditioneitol (DTT), 1µl de SuperScript III (SSIII) e incubou-se 60 minutos a 50°C e seguidamente 15 minutos a 70°C no termociclador. A partir desta fase, a síntese de cDNA fica completa e pode ser utilizado como DNA molde nas reações de PCR.

II.2.4.2 PCR

II.2.4.2.1 Amplificação dos fragmentos 5'UTR e 3'UTR do gene da Mob de *T. gondii*

Antes da realização da reação de PCR, procedeu-se à hidrólise do DNA genómico com o enzima Bam-HI, uma vez que tentativas anteriores de amplificação direta dos braços de homologia a partir do DNA genómico não tinham sido bem sucedidas. A hidrólise do DNA genómico altera a sua estrutura e o emparelhamento dos “primers”/síntese de DNA poderá ser facilitado. Os “primers” foram desenhados após consulta da sequência de DNA genómico de *T. gondii* na base de dados “ToxoDB”.

Amplificação da região 3'UTR

Para a amplificação da região 3'UTR a partir do DNA genómico de *T.gondii*, foram desenhados “primers” específicos (tabela 1) aos quais se acrescentou a sequência específica do enzima de restrição selecionado (verde) para posterior clonagem no vetor KO, bem como a sequência que irá otimizar a ação do enzima.

Após algumas tentativas para amplificação da região 3'UTR com o enzima “home made”, foi feita uma reação com 3 enzimas diferentes, “home made”, a Dream Taq DNA Polymerase” (New England Biolabs, NEB®) e a Phusion ® High-Fidelity DNA Polymerase. As componentes da “Mix” para a reação com a Dream Taq e com a Phusion foram segundo as recomendações do fabricante.

Uma vez que houve grande dificuldade em amplificar a região 3'UTR com os “primers” F – 3' mob e R – 3' mob, houve necessidade de desenhar novas sequências de “primers” para tentar ultrapassar essa dificuldade. Os novos pares de “primers” voltaram a falhar na amplificação da região 3' UTR. Desta forma, optou-se por fazer um cruzamento entre todos os “primers” (ver figura 6), juntamente com a realização de uma rampa de temperaturas no PCR. Ao longo da linha do termociclador a temperatura de emparelhamento para cada reação altera-se de acordo com o gradiente selecionado, de 50°C até 63°C. Os únicos que obtiveram produto de amplificação foram os “primers” F1 - 3' mob e o R2 - 3' mob (~2100pb), curiosamente um dos pares de “primers” cruzados. Posteriormente encomendou-se novos “primers” onde

foram adicionadas as sequências de reconhecimento para os enzimas de restrição que foram utilizados na clonagem do respectivo fragmento (*NotI* no “primer” F1 e *MfeI* no “primer” R2).

Tabela 1 – “Primers” desenhados para amplificar o fragmento 3’UTR

| | Sequência | Tm |
|------------------|--|-------|
| F – 3’ mob | ATAAGAAT GCGGCCGC ATC CCC TTA AAT CAG AGT TTC | 58 °C |
| R – 3’ mob | CCC CAATTG TAT GAA AAT GAC CCG AAC GC | 58 °C |
| F1 - 3’ mob | ATA AGA AT G CGG CCG C GAC AAC GGA CAC AGA CAG A | 58 °C |
| F2 – 3’3’ mob | TGTCTCCGGTGTGCTTGAG | 60 °C |
| R1 - 3’ mob | CA GGA AGC AAT GGA CTT TGA | 58 °C |
| R2 - 3’ mob | CCC CAA TTG GAC AGC AAG CCT GCG GTT | 58 °C |

A mistura da reação de PCR encontra-se descrita na tabela 2, e as condições gerais da reação de PCR na tabela 3 (Rampa de temperaturas utilizada para obter a região 3’UTR por PCR).

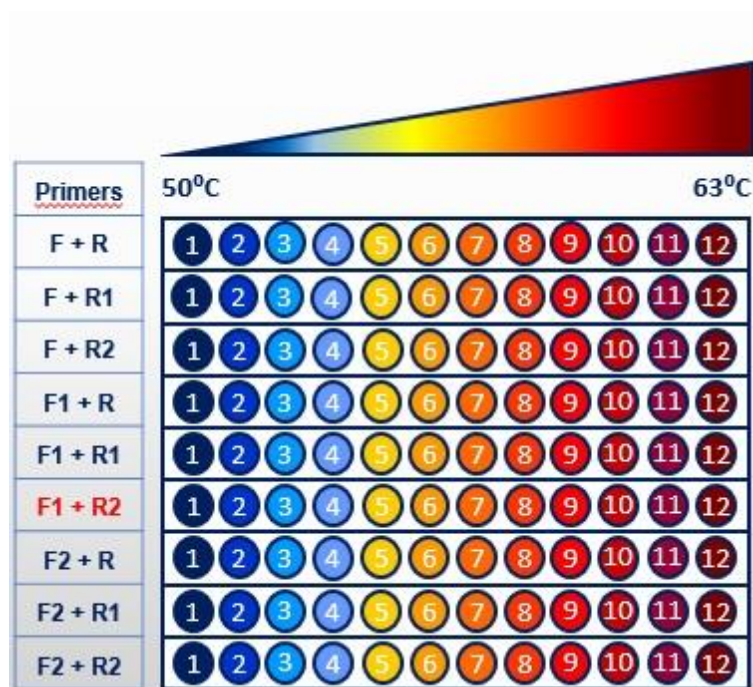


Figura 6 – Esquema da rampa de temperaturas utilizada para obter a região 3'UTR por PCR

Tabela 2 - Mistura de reação de PCR para amplificar a região 3' UTR

| Reagentes | Volume | Concentração final |
|--------------------------------------|---------|--------------------|
| Tampão de PCR 10x | 2,5µl | 1x |
| dNTPs 2mM | 2,5µl | 0,2 mM |
| MgCl ₂ 25mM | 1,25µl | 1.25 mM |
| Primer Forward 30pmol/µl | 1µl | -- |
| Primer Reverse 30pmol/µl | 1µl | -- |
| DNAg (40ng/µl) | 1µl | -- |
| Taq Polimerase concentração 1U/µl | 0,5µl | -- |
| Água | 15,25µl | -- |
| Volume final | 25µl | -- |

Tabela 3 - Condições da reação de PCR

| Etapas da reação | Tempo | Temperatura | Número de ciclos |
|------------------|--------|-------------|------------------|
| Desnaturação | 5 min | 95°C | 1x |
| Desnaturação | 30 seg | 95°C | 35x |
| Emparelhamento | 30 seg | 58°C | |
| Elongação | 2 min | 72°C | |
| Elongação | 15 min | 72°C | 1x |
| Arrefecimento | 5 min | 5°C | 1x |

Amplificação da 5'UTR

Para a amplificação da região 5'UTR a partir do DNA genômico de *T.gondii*, foram desenhados “primers” específicos (tabela 4) aos quais se acrescentou a sequência específica do enzima de restrição selecionada (verde), *SpeI* no caso do “primer” F-5'mob e *BamHI* para o R-5'mob, para posterior clonagem no vetor KO, bem como a sequência que irá otimizar a ação do enzima escolhido.

Tabela 4 - Primers desenhados para amplificar o fragmento 5'UTR

| | Sequência | Tm |
|------------|-------------------------------------|-------|
| F – 5' mob | GG ACTAGT GCG ACG CCC TTC GAA ACC | 60 °C |
| R – 5' mob | CG GGATCC AAG GCG ACG GCA AAC GAA G | 60 °C |

O produto de PCR esperado terá um tamanho de aproximadamente 2000pb.

A composição da mistura para a reação de PCR encontra-se descrita na tabela 3 (à semelhança da utilizada para amplificar a região 3' UTR), e as condições da reação de PCR na tabela 5.

Tabela 5 - Condições da reação de PCR

| Etapas da reação | Tempo | Temperatura | Número de ciclos |
|------------------|--------|-------------|------------------|
| Desnaturação | 5 min | 95°C | 1x |
| Desnaturação | 30 seg | 95°C | 35x |
| Emparelhamento | 30 seg | 59°C | |
| Elongação | 2 min | 72°C | |
| Elongação | 15 min | 72°C | 1x |
| Arrefecimento | 5 min | 5°C | 1x |

II.2.4.2.2 Amplificação do cDNA da Mob1

Para a amplificação do cDNA da Mob1 de *T.gondii*, foram desenhados “primers” específicos (tabela 6), após consulta da sequência de cDNA da Mob1 de *T. gondii* na base de dados “ToxoDB”, aos quais se acrescentou a sequência específica do enzima de restrição escolhido (verde), *Afl*III no caso do “primer” F mob KO e *Pac*I para o R mob KO, para posterior clonagem no vetor KO, bem como a sequência que irá otimizar a ação do enzima.

Tabela 6 - Primers desenhados para amplificar o cDNA da Mob1

| | Sequência | Tm |
|-----------------|---|-------|
| F mob KO | 5' CCC CTTAAG AAC TAC TGG ACG TCT TGG C 3' | 58 °C |
| R mob KO | 5' CCC TTAATTAA TCA AAA ACT GGC CTG AGA GC 3' | 60 °C |

O produto de PCR esperado terá um tamanho de aproximadamente 942pb.

A composição da mistura de reação de PCR encontra-se descrita na tabela 3 (à semelhança da utilizada para amplificar a região 3' UTR e 5'UTR), e as condições gerais da reação de PCR na tabela 7.

Tabela 7 - Condições da reação de PCR

| Etapas da reação | Tempo | Temperatura | Número de ciclos |
|------------------|--------|-------------|------------------|
| Desnaturação | 5 min | 95°C | 1x |
| Desnaturação | 30 seg | 95°C | 35x |
| Emparelhamento | 30 seg | 56°C | |
| Elongação | 30 seg | 72°C | |
| Elongação | 15 min | 72°C | 1x |
| Arrefecimento | 5 min | 5°C | 1x |

II.2.5 Eletroforese de DNA

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v) em tampão TAE 1X (Tris 40 mM, EDTA 1mM pH8.3) ao qual se adicionou 10 µl, por cada 1L de H₂O, de “green safe”, corante de DNA, segundo recomendação do fabricante (NZYTech). Às amostras de DNA adicionou-se tampão de amostra [Ficoll 400 2,5% (m/v), EDTA 16mM pH 8,0, Azul bromofenol 0,2% (m/v) em TAE 1X]. No gel, foi aplicado um marcador de DNA da “Thermofisher 1Kb” (Fisher), a partir do qual estimou-se a massa molecular dos fragmentos de DNA. A eletroforese decorreu durante cerca de 60 minutos a 80V. A imagem digital foi capturada com o sistema de aquisição de imagem Pharmacia da Biotech e com o programa Liscap (Pharmacia Biotech).

II.2.6 Extração e purificação de fragmentos de DNA a partir de um gel de agarose

A extração e purificação de DNA foi feita a partir do gel de agarose, do qual se cortou a banda de DNA com o tamanho esperado. A extração foi feita com o QIAquick-Gel Extraction Kit (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante.

Após a obtenção do DNA, foi feita a quantificação do mesmo recorrendo ao Nanodrop 2000c (Thermoscientific).

II.2.7 Sub-clonagem do fragmento 3'UTR no vetor p-GEM T-Easy

Tal como descrito na secção II.4.2.1, a obtenção da região 3'UTR não foi imediata, como tal optou-se por clonar o fragmento amplificado num vetor específico para produtos de PCR, o vetor p-GEM T-Easy. O fragmento será removido por hidrólise para posterior clonagem no vetor KO, desta forma, temos a certeza que fragmento está bem hidrolisado em ambas as extremidades. Este vetor tem a particularidade de nas suas extremidades possuir uma deoxitimidina (T) que irá permitir a ligação imediata dos fragmentos resultantes do PCR que se encontram adenilados, com o auxílio do enzima T4 DNA ligase.

II.2.7.2 Ligação

Foi feita a reação de ligação, num volume final de 10µl, utilizando 40ng de vetor e, para calcular a concentração de fragmento a adicionar à reação, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\frac{n(\text{vetor})}{pb(\text{vetor})} = \frac{n(\text{fragmento})}{pb(\text{fragmento})} \Leftrightarrow \frac{40 \text{ ng}}{3015 \text{ pb}} = \frac{n(\text{fragmento})}{2100 \text{ pb}} \times 10$$

Assim, para a ligação usou-se 40 ng de vetor e 27,87 ng de fragmento, juntamente com 1µl de tampão da ligase (10X), 1µl de ligase (1U) e, caso necessário, perfazer os 10 µl da reação com água estéril. O período de incubação foi de cerca de

12 horas a 4°C. Para avaliar a eficiência da ligação é fundamental a utilização de um controlo negativo, sujeito exatamente ao mesmo procedimento, exceto a adição do fragmento de DNA. Este controlo permite avaliar as re-ligações do plasmídeo devido às hidrólises parciais.

Após a reação de ligação transformou-se bactérias competentes (ponto I.1.1 do presente capítulo).

II.2.8 Reação de PCR para testar se as colónias bacterianas são recombinantes – “Colony PCR”

Após a obtenção dos transformantes, picou-se as colónias obtidas para dentro de um tubo de PCR e efetuou-se um riscado (figura 7), os riscados foram numerados de acordo com a numeração dos tubos de PCR. De seguida fez-se uma reação de PCR para identificar quais as colónias recombinantes (positivas, que inseriram o fragmento no vetor) e selecionar as mesmas para extrair DNA plasmídico em pequena escala.

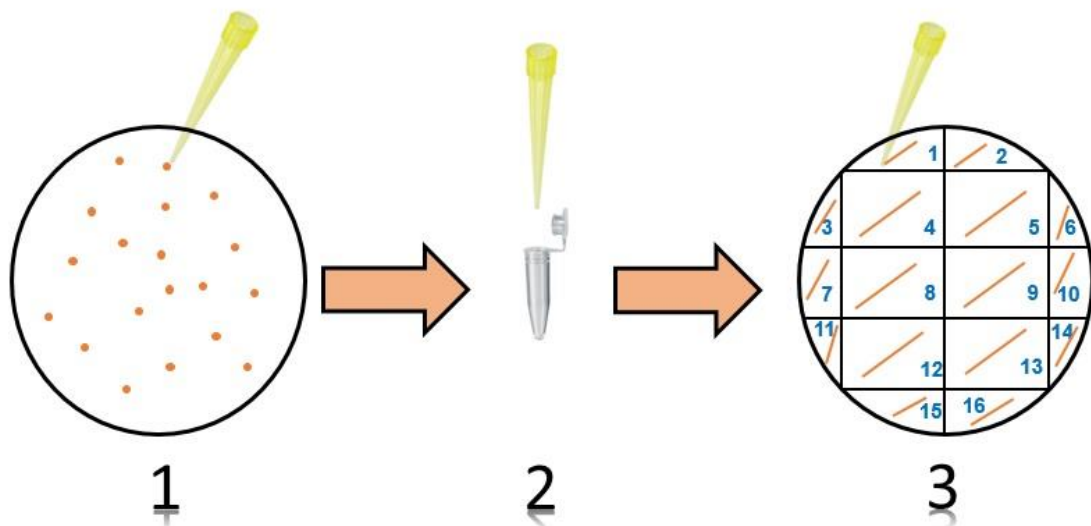


Figura 7 - Esquema do teste das colónias bacterianas. As colónias são picadas da placa de cultura com uma ponta, a colónia é colocada dentro de um tubo de PCR e é feito um riscado bacteriano, utilizando a mesma ponta, numa nova placa de cultura.

Para testar as colónias, foram desenhados “primers” para amplificar uma sequência interna da região 3’UTR (“primers” internos, tabela 8).

Tabela 8 - “Primers” desenhados para testar as colónias

| | Sequência | Tm |
|--------------------|----------------------------|-------|
| F_3_int_mob | 5' GATCTGCATTGCTAGCGACA 3' | 58 °C |
| R_3_int_mob | 5' GACAGGAAAGGCACAGAGGA 3' | 58 °C |

O produto de PCR esperado terá um tamanho de aproximadamente 698pb caso as colónias sejam positivas, ou seja, caso o plasmídeo tenha integrado o fragmento com o qual se efetuou a ligação.

A composição da mistura para a reação de PCR encontra-se descrita na tabela 3 (à semelhança das misturas utilizadas nas reações de PCR anteriores). As condições da reação de PCR encontram-se descritas na tabela 9.

Tabela 9 - Condições da reação de PCR

| Etapas da reação | Tempo | Temperatura | Número de ciclos |
|------------------|--------|-------------|------------------|
| Desnaturação | 5 min | 95°C | 1x |
| Desnaturação | 30 seg | 95°C | 35x |
| Emparelhamento | 30 seg | 55°C | |
| Elongação | 1 min | 72°C | |
| Elongação | 15 min | 72°C | 1x |
| Arrefecimento | 5 min | 5°C | 1x |

II.2.9 Confirmação das seqüências nucleotídicas por sequenciação automática

Após a identificação dos clones positivos por “colony PCR”, estes foram analisados por sequenciação automática, de forma a determinar se as seqüências clonadas foram inseridas corretamente e comprovar a ausência de erros/mutações.

As reações de sequenciação foram feitas com o “Big Dye Terminator 1.1 Cycle Sequencing Kit” por PCR (25 ciclos compostos por 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C). A seqüência dos “primers” utilizados para a sequenciação encontra-se na tabela 10. Após a reação de PCR, o produto de amplificação foi precipitado com 1/10 do volume de CH₃COONa (acetato de sódio) 3M e 2,5 volumes de etanol absoluto durante 15 minutos. De seguida foram centrifugados a 16100 x g durante 15 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e deixou-se o sedimento de DNA a secar. Os tubos foram, posteriormente, enviados para o Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC) para sequenciar as amostras. O sequenciador utilizado para a sequenciação automática foi o “ABI Prism 377 DNA Sequencer” (Applied Biosystems). O “software” utilizado para o “377 DNA Sequencer” requer o “filter set E” e “377 BigDye Terminator v1.1 Matrix Standards”. Foram feitos 1200 “scans”/hora.

Table 10 - “Primers” utilizados para sequenciar a região 3'UTR

| | Seqüência | Tm |
|--------------------------|----------------------------|-------|
| 5 - 3 UTR mob Seq | 5' GATCTGCATTGCTAGCGACA 3' | 60 °C |
| 3 - 3 UTR mob Seq | 5' GACAGGAAAGGCACAGAGGA 3' | 60 °C |

II.3 Clonagem dos fragmentos no vetor “knockout” (KO) de *T. gondii*

A estratégia adotada para a construção do KO condicional em *T. gondii*, implica a substituição do gene Mob1 “wild-type” no genoma, por outro flanqueado por dois locais “loxP”. Estes locais serão reconhecidos pela enzima Cre recombinase e, na sua presença, ocorrerá a excisão do gene. A construção será posteriormente inserida, por recombinação homóloga (através dos braços de homologia da região 5’ e na região 3’), na estirpe *T. gondii* *Ku80::diCre*.

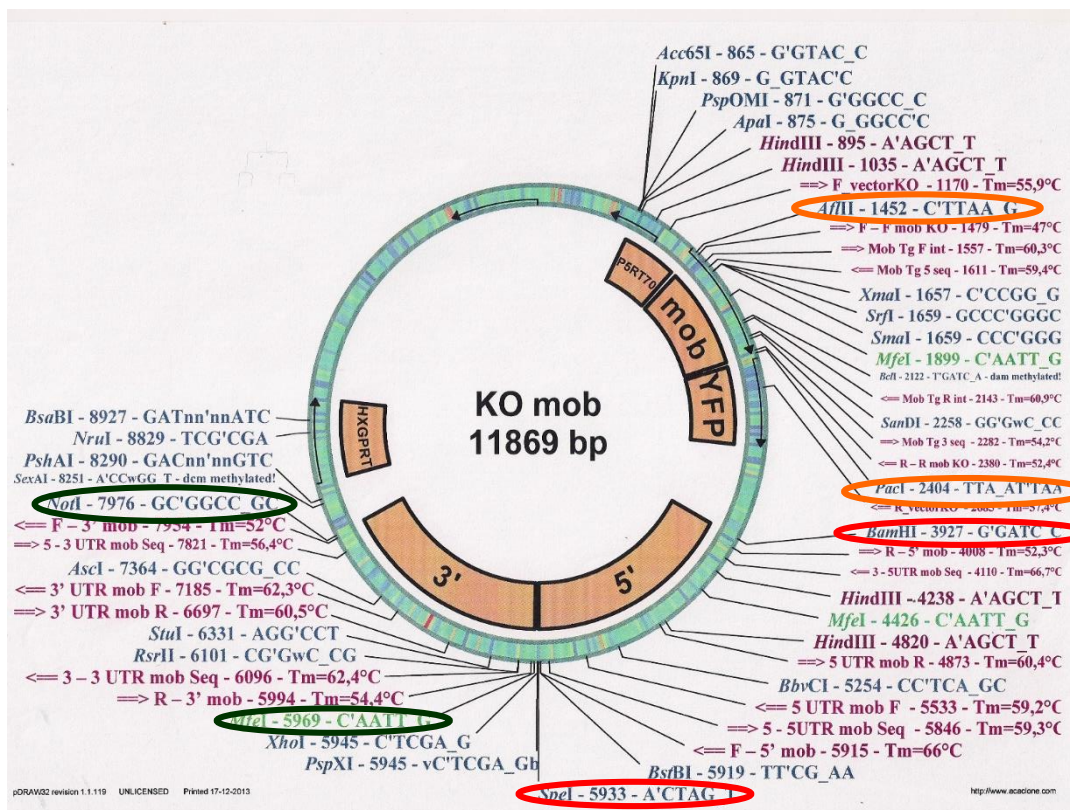


Figura 8 - Construção KO Mob1

Os enzimas escolhidos para a clonagem têm que existir no vetor e não hidrolisar o fragmento que irá ser clonado (Figura 8). Desta forma, as sequências de reconhecimento dos enzimas selecionados foram adicionadas às sequências dos “primers” utilizados nas reações de PCR de cada fragmento a clonar.

Serão clonadas 3 sequências distintas neste vetor, cDNA da Mob, 3'UTR e 5'UTR e há que ter em conta que cada sequência clonada leva consigo novos locais de restrição. Por esta razão, foi necessário criar uma ordem de clonagem dos diferentes fragmentos para não arriscar a hidrólise do vetor mais do que uma vez.

Assim, o primeiro fragmento a ser clonado será a região 3'UTR, depois será a região 5'UTR e por último o cDNA da Mob1.

II.3.1 Hidrólise dos fragmentos e do vetor

Fragmento 3'UTR

Para a hidrólise do fragmento 3'UTR, foram utilizados os enzimas *NotI* (1U) e *MfeI* (1U) (NEB), num volume de reação final de 30 µl. Aos enzimas adicionou-se 3 µl de tampão CutSmart 10x (NEB) e 25 µl de DNA (1200ng). A hidrólise decorreu durante cerca de 16h, em banho-maria, a 37°C.

Para a hidrólise do vetor, foram utilizados os mesmos enzimas da hidrólise do fragmento. No caso do vetor hidrolisou-se 1400ng.

Após a hidrólise desfosforilou-se o vetor, para minimizar religações do mesmo aquando da ocorrência de hidrólises parciais. Nesta reação utilizou-se o volume total da reação (30 µl), ao qual se adicionou 3,5 µl de tampão da Fosfatase 10x e 1 µl de Fosfatase Alcalina (1U) (BioRad). A reação decorreu durante 2h a 37°C.

Para terminar a reação procedeu-se à inativação do enzima incubando a reação durante 20 minutos a 65°C.

Fragmento 5'UTR

Para a hidrólise do fragmento 5'UTR, foram utilizados os enzimas *SpeI* (1U) e *BamHI* (1U) (NEB), num volume de reação final de 30 µl. Aos enzimas adicionou-se 3 µl de tampão CutSmart 10x e 25 µl de DNA (1200ng). A hidrólise decorreu durante cerca de 16h a 37°C.

Tal como descrito anteriormente, o vetor que nesta fase já continha a região 3'UTR foi também hidrolisado com os enzimas utilizados para a hidrólise da região 5'UTR.

À semelhança da hidrólise do vetor, também se procedeu à desfosforilação do volume total da reação de hidrólise do fragmento correspondente ao vetor já com a região 3'UTR.

Para terminar a reação procedeu-se à inativação do enzima incubando a reação durante 20 minutos a 65°C.

II.3.2 Hidrólise do cDNA Mob1

O cDNA correspondente à proteína Mob1 foi hidrolisado com os enzimas *AflII* e *PacI*, num volume de reação final de 30 µl. Aos enzimas adicionou-se 3 µl de tampão CutSmart 10x e 4,5 µl de DNA (1200ng). A hidrólise decorreu durante cerca de 16h, em banho-maria, a 37°C.

II.3.3 Mistura de ligação

As reações de ligação dos fragmentos ao vetor KO foram feitas de acordo com o descrito no ponto II.2.7.2.

Fragmento 3'UTR

Para a mistura de ligação do fragmento 3'UTR ao vetor KO, previamente hidrolisados, adicionou-se 115ng de fragmento para 40ng de vetor, 1µl de tampão Ligase 10x e 1U de Ligase (Fermentas).

Para avaliar a eficiência da ligação é fundamental a utilização de um controlo negativo, sujeito exatamente ao mesmo procedimento, exceto a adição do fragmento de DNA. Tal como descrito na secção II.2.7.2.

A reação de ligação do fragmento ao vetor foi feita durante aproximadamente 12h, a 4°C.

Após a reação de ligação, procedeu-se à transformação de bactérias competentes de acordo com o descrito no ponto II.1.1.4. Feita a transformação, foram testadas as colónias (“Colony PCR”) utilizando os “primers” internos da região 3’UTR e o mesmo procedimento do ponto II.2.8.

Fragmento 5’UTR

Para a mistura de ligação do fragmento 5’UTR ao vetor KO, já com a região 3’UTR clonada e previamente hidrolisados, adicionou-se 115ng de fragmento para 40ng de vetor, 1µl de tampão Ligase 10x e 1U de Ligase (Fermentas). À semelhança do referido na secção II.3.3, também aqui foi preparado um controlo negativo.

A reação de ligação do fragmento ao vetor foi feita durante aproximadamente 12h, a 4°C.

Após a reação de ligação, procedeu-se à transformação de bactérias competentes de acordo com o descrito no ponto II.1.1.4. Feita a transformação, foram testadas as colónias (“Colony PCR”), segundo o procedimento explicado no ponto II.2.7.2 do presente capítulo, utilizando os “primers” internos da região 5’UTR apresentados na tabela 11, as condições de PCR encontram-se descritas na tabela 12 e o produto de PCR é de cerca de 660 pb.

Table 11 - “Primers” utilizados para o “Colony PCR” da 5’UTR

| | Sequência | Tm |
|--------------------|---------------------------------------|-------|
| 5’UTR_Mob_R | 5’ GGGTTTGCTTTTCTCTGCGG ^{3’} | 60 °C |
| 5’UTR_Mob_F | 5’ AATCATGAAGCGAATGCGGC ^{3’} | 62 °C |

Tabela 102 - Condições da reação de PCR

| Etapas da reação | Tempo | Temperatura | Número de ciclos |
|------------------|--------|-------------|------------------|
| Desnaturação | 5 min | 95°C | 1x |
| Desnaturação | 30 seg | 95°C | 35x |
| Emparelhamento | 30 seg | 58°C | |
| Elongação | 1 min | 72°C | |
| Elongação | 15 min | 72°C | 1x |
| Arrefecimento | 5 min | 5°C | 1x |

II.4 Preparação de DNA plasmídico

II.4.1 Em pequena escala (“minipreps”)

Após seleção dos transformantes recombinantes pelo teste do PCR em colônias, estes foram “picados” à chama com o auxílio de uma ponta que serviu para inocular meio LB líquido suplementado com ampicilina. Incubou-se a cultura durante a noite a 37°C com uma agitação de 180rpm.

No dia seguinte, centrifugou-se 3ml da cultura bacteriana durante um minuto, a 6000g, à temperatura ambiente. Para a preparação de DNA plasmídico em pequena escala foi utilizado o kit QIAprep®spin Miniprep (50) (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante.

II.1 Em média escala (“midipreps”)

Após a confirmação por sequenciação da correta inserção dos fragmentos e da ausência de mutações, os plasmídeos recombinantes foram usados para transformar bactérias competentes para serem amplificadas e proceder-se à sua preparação em média escala. Para isso, as células transformadas foram usadas para inocular meio LB líquido (100ml) suplementado com ampicilina. As culturas cresceram durante a noite a 37°C com agitação de 180 rpm e depois foram utilizadas para extrair DNA plasmídico com o Plasmid Midi Kit (QIAGEN), de acordo com as recomendações do fabricante.

Capítulo III

Resultados

III.1 Amplificação dos fragmentos 3'UTR e 5'UTR da Mob, a partir de DNA genómico de *T. gondii*

III.1.1 Amplificação da região 3'UTR da Mob de *T. gondii*

Para amplificar a região 3'UTR a partir de DNA genómico, foram desenhados “primers” específicos (F – 3'UTR e R – 5'UTR) que originaram um produto de amplificação de aproximadamente 2000 pb. As condições de PCR encontram-se descritas no ponto II.2.4.2.1.

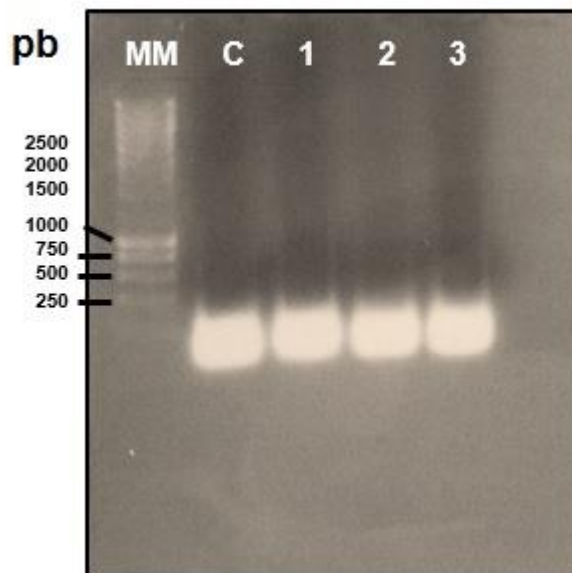


Figura 9 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR. Após a reação de PCR os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder), C- Controlo negativo (amostra sem DNA molde), 1, 2 e 3 - Produtos de PCR para a região 3'UTR com os “primers” F – 3'UTR e R – 3'UTR.

Através da análise da figura 9 observa-se que não houve amplificação do fragmento previsto com 2000 pb, sendo a banda observada correspondente aos “primers” que não foram utilizados.

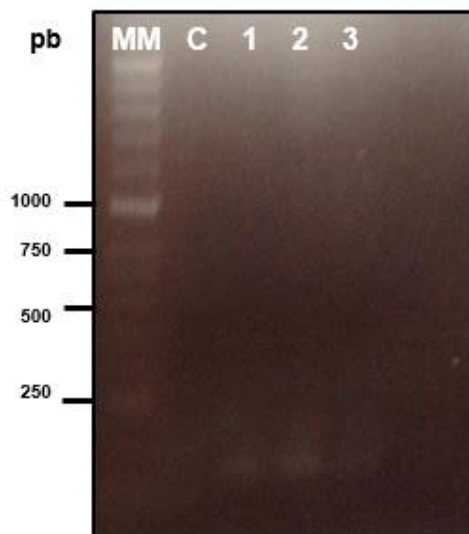


Figura 10 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR. Após a reação de PCR os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder), C- Controle negativo (amostra sem DNA molde), 1, 2 e 3 - Produtos de PCR para a região 3'UTR com os “primers” F – 3'UTR e R – 3'UTR.

Após análise da figura 10, continua-se a não se observar a presença do produto de amplificação na eletroforese. Desta forma, optou-se por hidrolisar o DNA genómico com o enzima *Bam*-HI (enzima de restrição que não hidrolisa o nosso fragmento de interesse) para tentar facilitar o emparelhamento dos “primers” através da fragmentação do DNA genómico e consequente alteração estrutural do mesmo.

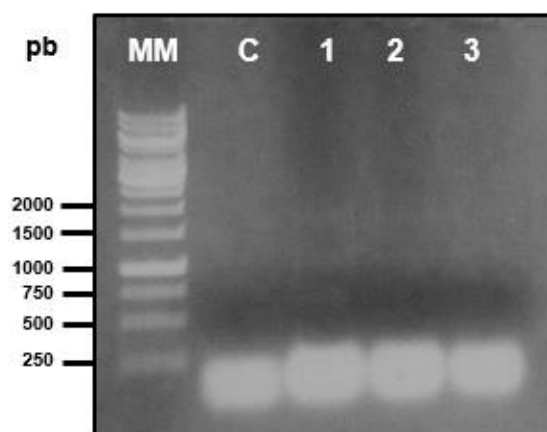


Figura 11 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR após hidrólise do DNA genómico com a enzima *Bam*HI. Após a reação de PCR os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder), C- Controle negativo (amostra sem DNA molde), 1, 2 e 3 - Produtos de PCR para a região 3'UTR com os “primers” F – 3'UTR e R – 3'UTR.

Devido à ausência de sucesso na amplificação da região 3'UTR (figura 11), fez-se um gradiente de temperaturas (de 55°C a 63.5°C) para tentar encontrar a temperatura ideal de emparelhamento dos “primers” (consultar imagem secção II.1).

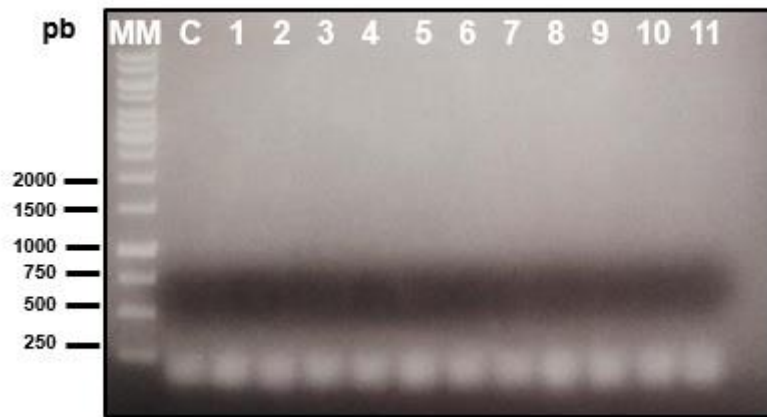


Figura 12 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR a diferentes temperaturas de hibridação dos “primers”. Após a reação de PCR os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder), C- Controlo negativo (amostra sem DNA molde) com os “primers” F – 3'UTR e R – 3'UTR; 1-11 - Produtos de PCR para amplificação da região 3'UTR com os “primers” F – 3'UTR e R – 3'UTR (a reação 1 corresponde à temperatura de 55°C que aumenta gradualmente até aos 63,5°C, reação 11).

A figura 12 volta a demonstrar a ausência do produto de amplificação da região 3'UTR. Desta forma, efetuou-se nova extração de DNA genómico de *T.gondii*, para excluir a hipótese do DNA molde não estar em boas condições. De seguida, procedeu-se novamente à hidrólise do DNA genómico com a enzima *Bam*-HI e procedeu-se a novas reações de PCR.

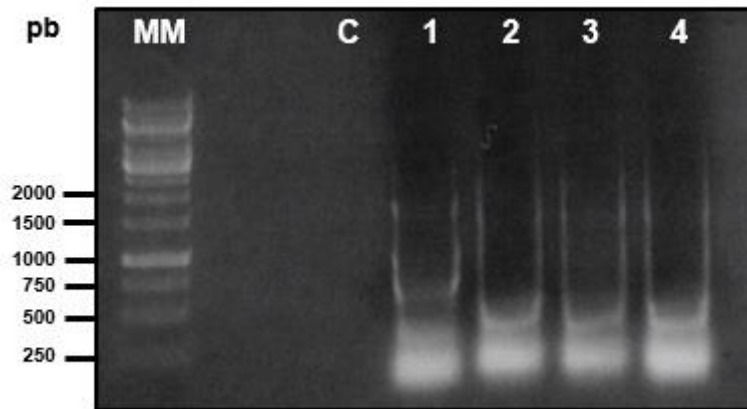


Figura 13 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR após hidrólise do DNA genómico com a enzima *Bam*HI. Após a reação de PCR os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder), C- Controlo negativo (amostra sem DNA molde) com os “primers” F – 3'UTR e R – 3'UTR, 1-4 - Produtos de PCR para a região 3'UTR com os “primers” F – 3'UTR e R – 3'UTR.

A figura 13 demonstra a não amplificação do fragmento esperado. Repetiu-se o PCR com as mesmas condições.

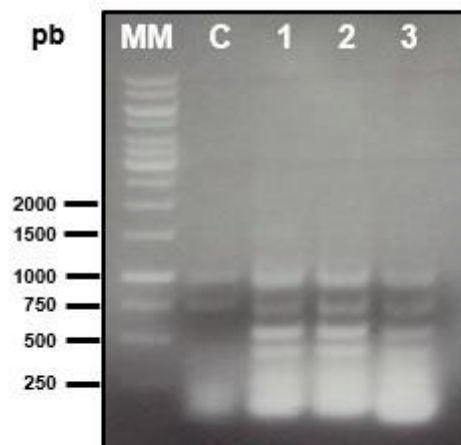


Figura 14 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR após hidrólise do DNA genómico com a enzima *Bam*HI. Após a reação de PCR os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder), C- Controlo negativo (amostra sem DNA molde) com os “primers” F – 3'UTR e R – 3'UTR, 1-3 - Produtos de PCR para a região 3'UTR com os “primers” F – 3'UTR e R – 3'UTR.

A figura 14 demonstra a amplificação de várias bandas provavelmente inespecíficas uma vez que nenhuma delas corresponde ao tamanho esperado (2000 pb). Não se deveriam observar produtos de amplificação no controlo negativo, indicando que a existência das mesmas poderá ser devida a alguma contaminação. A

fim de tentar compreender a origem da contaminação foram feitas várias reações de PCR, onde em cada reação era substituído um dos componentes da mistura de reação por outro novo. Após a substituição de todos os reagentes o controlo negativo permanecia contaminado, exceto quando se utilizou uma enzima nova.

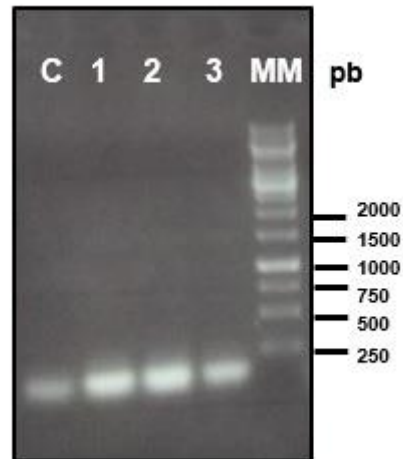


Figura 15 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR após hidrólise do DNA genómico com a enzima *Bam*HI. Após a reação de PCR os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder), C- Controlo negativo (amostra sem DNA molde) com os “primers” F – 3'UTR e R – 3'UTR, 1-3 - Produtos de PCR para a região 3'UTR com os “primers” F – 3'UTR e R – 3'UTR.

Apesar de se ter eliminado a contaminação a figura 15 volta a revelar ausência de produto de amplificação da região 3'UTR, voltando a optar-se por efetuar um novo gradiente de temperaturas com as mesmas condições e com temperaturas entre 55°C e 61.3°C.

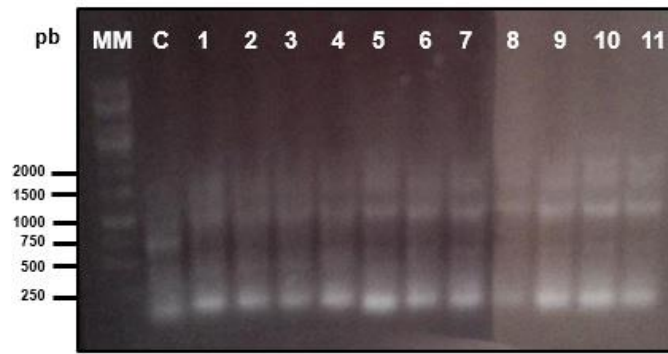


Figura 16 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR a diferentes temperaturas de hibridação dos “primers”. Após a reação de PCR os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder), C- Controlo negativo (amostra sem DNA molde) com os “primers” F – 3'UTR e R – 3'UTR, 1-11 - Produtos de PCR para amplificação da região 3'UTR com os “primers” F – 3'UTR e R – 3'UTR (a reação 1 corresponde à temperatura de 55°C que aumenta gradualmente até aos 63,5°C, reação 11).

Após a análise da figura 16, parece haver a presença de uma banda com o tamanho esperado (2000pb), a partir da amostra 5, para além da presença de bandas inespecíficas inclusivamente no controlo negativo.

Repetiu-se a reação de PCR, nas mesmas condições, selecionando-se a temperatura referente a uma das amostras onde houve produto de amplificação (61°C).

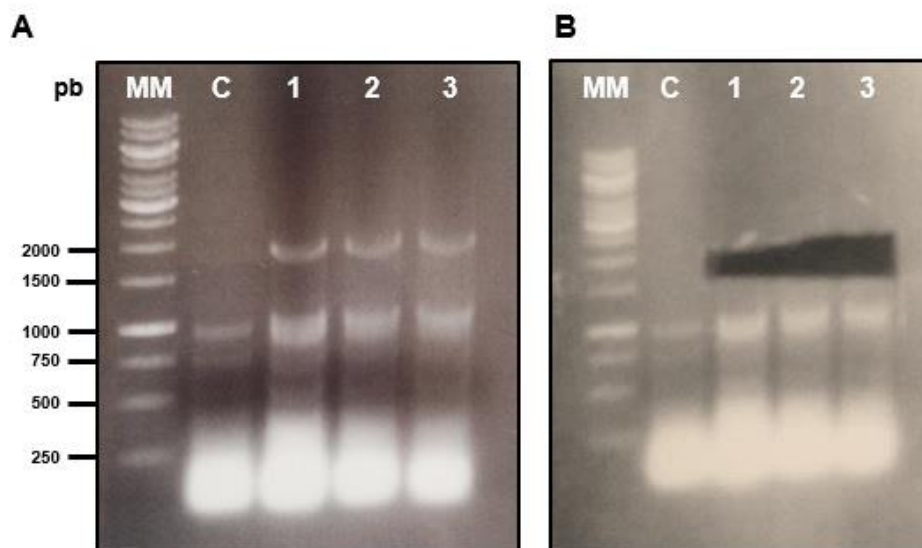


Figura 17 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR após hidrólise do DNA genómico com a enzima *Bam*HI, à temperatura de 61°C. Após a reação de PCR os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder), C- Controlo negativo (amostra sem DNA molde), 1-3 -

Produtos de PCR para a região 3'UTR com os "primers" F – 3'UTR e R – 3'UTR. A) Antes da extração das bandas do gel, para purificação do DNA; B) Após a extração das bandas de DNA do gel.

No gel da figura 17A, identificou-se as bandas com o tamanho esperado e procedeu-se ao corte e remoção das mesmas para extração do DNA. A figura 17B confirma a correta remoção das bandas do gel.

Após a extração quantificou-se o DNA obtido, inesperadamente, não se detetou DNA na amostra. Repetiu-se a quantificação e confirmou-se a ausência de DNA. Repetiu-se a reação de PCR com as mesmas condições para voltar a fazer nova extração de DNA.

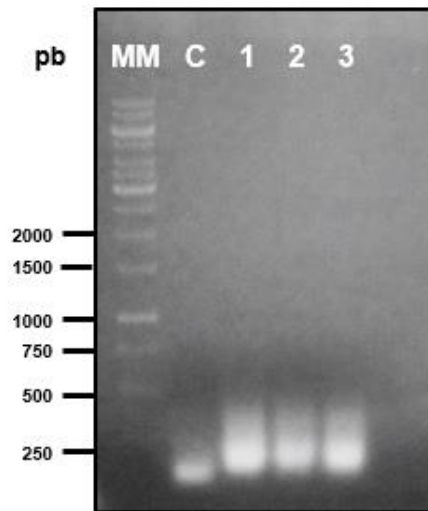


Figura 18 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR após hidrólise do DNA genómico com a enzima *Bam*HI, à temperatura de 61°C. Após a reação de PCR os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder), C- Controlo negativo (amostra sem DNA molde), 1-3 - Produtos de PCR para a região 3'UTR com os "primers" F – 3'UTR e R – 3'UTR.

Infelizmente voltou a verificar-se a ausência do produto de amplificação (figura 18). Prepararam-se 3 novas reações de PCR para testar ao mesmo tempo 3 DNA polimerases diferentes.

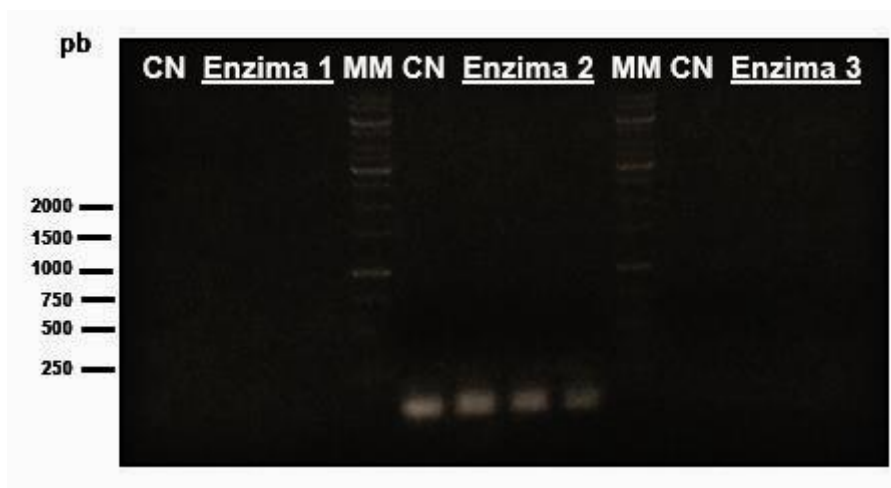


Figura 19 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR após hidrólise do DNA genómico com a enzima *Bam*HI, à temperatura de 61°C, utilizando 3 DNA polimerases diferentes. MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder); CN - controlo negativo; Reações de amplificação com o enzima 1; Reações de amplificação com o enzima 2 e Reações de amplificação com o enzima 3.

Continuou-se a verificar a ausência de produtos de PCR (figura 19).

Desenharam-se novos “primers” (ver tabela 1 do capítulo referente aos Materiais e métodos) e efetuou-se um PCR para cada um dos novos pares de “primers”.

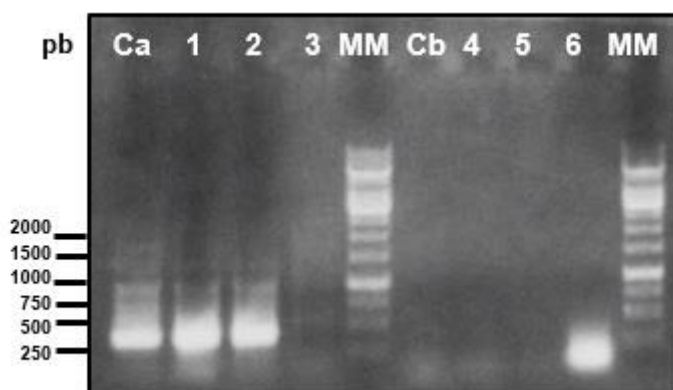


Figura 20 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR após hidrólise do DNA genómico com a enzima *Bam*HI, à temperatura de 61°C, utilizando os novos pares de primers. MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder); Ca - Controlo negativo; 1-3 - reações de amplificação com os “primers” F – 3'UTR e R – 3'UTR; Cb – Controlo negativo 4-6 - reações de amplificação com os “primers” F2 – 3'mob e R2 – 3'mob

Uma vez que também não se obteve qualquer produto de amplificação com os novos “primers” (Figura 20), optou-se por fazer um cruzamento entre todos os “primers” desenhados (ver tabela 1 do capítulo II), juntamente com o gradiente de

temperaturas para cada reação, entre 50°C e 63°C (ver figura 1 do capítulo II). As imagens referentes aos dois géis de eletroforese em gel de agarose com os produtos de amplificação das restantes reações ficaram em mau estado, não sendo por isso apresentadas neste trabalho.

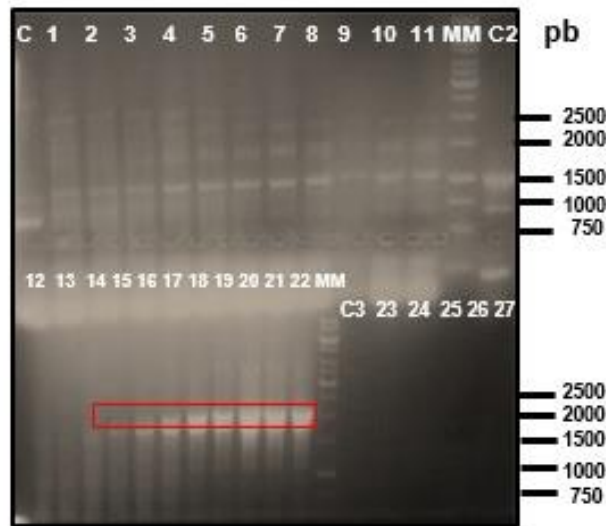


Figura 21 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR, com os novos pares de “primers” a diferentes temperaturas de hibridação. Após a reação de PCR os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder), C, C2 e C3 - Controlo negativo (C) (amostra sem DNA molde), 1-11 - Produtos de PCR para amplificação da região 3'UTR com os “primers” F1 – 3'UTR e R1 – 3'UTR (ao reação 1 corresponde à temperatura de 50°C que aumenta gradualmente até aos 61,3°C, reação 11); 12-22 - Produtos de PCR para amplificação da região 3'UTR com os “primers” F1 – 3'UTR e R2 – 3'UTR (a reação 12 corresponde à temperatura de 50°C que aumenta gradualmente até aos 61,3°C, reação 22); 23-27 – Produtos de PCR para amplificação da região 3'UTR com os “primers” F2 – 3'UTR e R – 3'UTR (a reação 23 corresponde à temperatura se 50°C que aumenta gradualmente até aos 55.4, reação 2).

Analisando a parte superior do gel (figura 21), referente aos produtos de PCR obtidos com a utilização dos “primers” F1 – 3'UTR e R1 – 3'UTR, nas primeiras reações (1-5) parece haver um produto com o tamanho esperado. O controlo negativo (C) parece estar contaminado, verificando-se a presença de bandas no mesmo. Relativamente à parte inferior do gel, referente aos produtos de PCR obtidos com a utilização dos “primers” F1 – 3'UTR e R2 – 3'UTR, parece claro que a partir do poço 16 há produto de amplificação, neste caso com o tamanho esperado, cerca de 2100 pb. Para obter maior quantidade do produto amplificado, preparou-se nova reação de PCR com os “primers” F1 – 3'UTR e R2 – 3'UTR e com a temperatura de emparelhamento de 60°C.

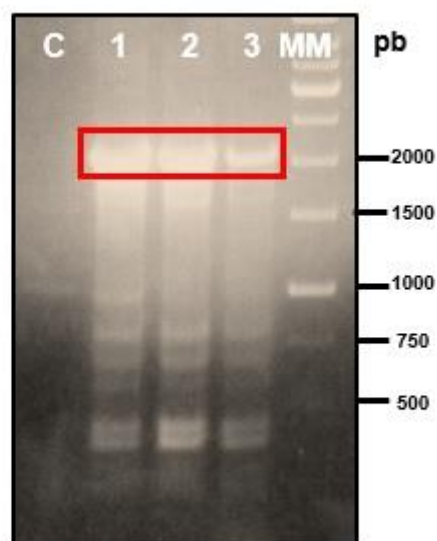


Figura 22 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação da região 3'UTR após hidrólise do DNA genómico com o enzima *Bam*HI, à temperatura de 60°C, utilizando os “primers” F1 – 3'mob e R2 – 3'mob. MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder); C- Controlo negativo (amostra sem DNA molde), 1-3 - Produtos de PCR para amplificação da região 3'UTR.

Analisando a figura 22 é possível observar as bandas de DNA com o tamanho esperado (2100 pb) e, apesar de se verificar a presença de bandas inespecíficas e do controlo negativo se encontrar contaminado, procedeu-se ao corte e remoção das bandas para extração do DNA. Desta vez o DNA foi extraído com sucesso.

Tal como descrito no ponto II.2.7 do capítulo III, foi feita a clonagem do fragmento 3'UTR no vetor p – GEM T-Easy. Foi feita a reação de ligação e transformação de bactérias competentes, a partir das quais se picou as colónias obtidas e testou-se por PCR, confirmando assim se o plasmídeo tinha integrado o fragmento.

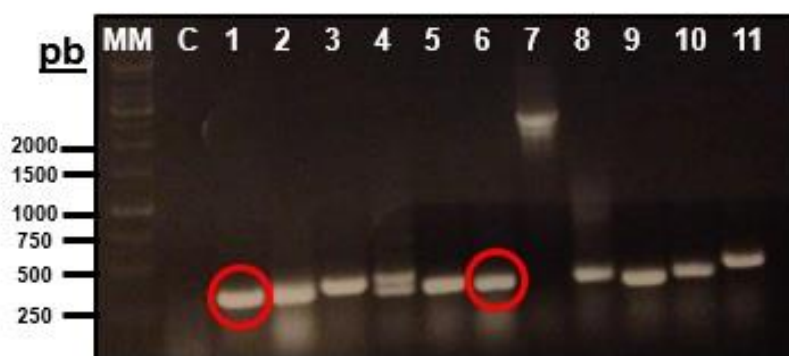


Figura 23 - Análise eletroforética dos resultados obtidos por “Colony PCR” referente à clonagem da 3’UTR no vetor p – GEM T-Easy. Após o “colony PCR” as reações de amplificação foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM – Marcador de massa molecular (O’GeneRuler 1kb DNA Ladder); C- Controlo negativo (amostra sem DNA molde), 1-11 - Produtos de PCR.

Após análise da eletroforese do “colony PCR” (Figura 23), selecionaram-se as colónias 2 e 7 para extração de DNA plasmídico e posterior confirmação da sequência da região 3’UTR por sequenciação automática.

Com os resultados da sequenciação verificou-se que o produto correspondia de facto à região 3’UTR e não se encontrou qualquer alteração da sequência.

Uma vez que os “primers” F1 – 3’UTR e R2 – 3’UTR não tinham a sequência de reconhecimento para as enzimas de restrição, teve que ser feita uma nova reação de PCR a partir do vetor T-easy com os “primers” contendo os locais de restrição desejados.

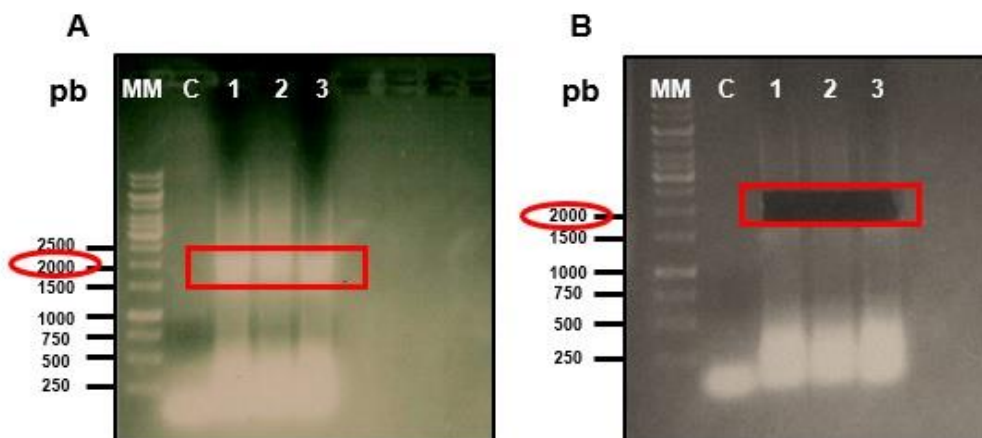


Figura 24 - Análise eletroforética da amplificação da região 3'UTR, a partir do vetor p-GEM T-Easy, com os “primers” contendo os locais de restrição. Após o PCR as reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder), C- Controlo negativo (amostra sem DNA molde), 1, 2 e 3 - Produtos de PCR para a região 3'UTR com a partir do vetor p-Gem T-Easy. A) imagem do gel antes da extração das bandas de DNA e B) imagem do gel após extração das bandas de DNA.

Analisando a figura 24A, verifica-se a presença das bandas com o tamanho esperado, procedeu-se ao corte e remoção das bandas para extração do DNA. A figura 24B, confirma que as bandas referentes ao produto de PCR esperado foram removidas na totalidade. O DNA foi extraído com sucesso.

III.1.2 Amplificação da região 5'UTR

Para amplificar a região 5'UTR a partir de DNA genómico foram desenhados “primers” específicos (F – 3'mob e R – 5'mob), que permitem amplificar um fragmento de DNA de 2000 pb. As condições de PCR encontram-se descritas no ponto II.2.4.2. Uma vez que a obtenção do fragmento 3'UTR não foi imediata, optou-se logo por fazer um gradiente de temperaturas de hibridação (58°C – 62.2°C).

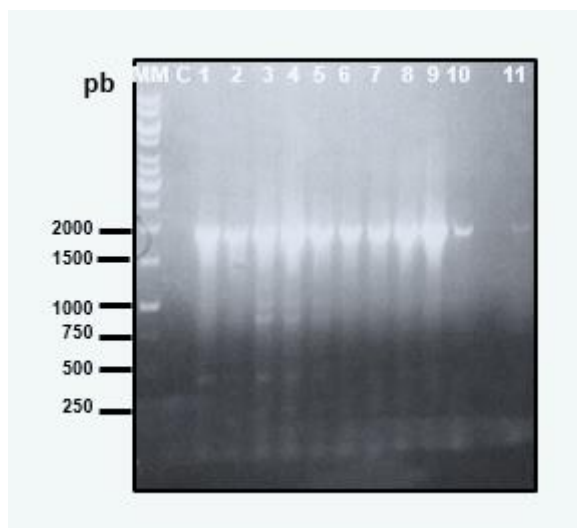


Figura 25 - Análise eletroforética das reações de PCR para a amplificação da região 5'UTR, utilizando um gradiente de temperaturas. Após o PCR as reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder); C- Controle negativo (amostra sem DNA molde); 1-11 - Produtos de PCR para a amplificação da região 5'UTR (a reação 1 corresponde à temperatura de 58°C que aumenta gradualmente até aos 62°C).

Através da análise da figura 25, verifica-se a presença de banda com o tamanho esperado (2000 pb). Contudo o controlo negativo encontra-se contaminado, com um fragmento de tamanho inferior. Repetiu-se a reação de PCR a uma temperatura de emparelhamento de 59°C.

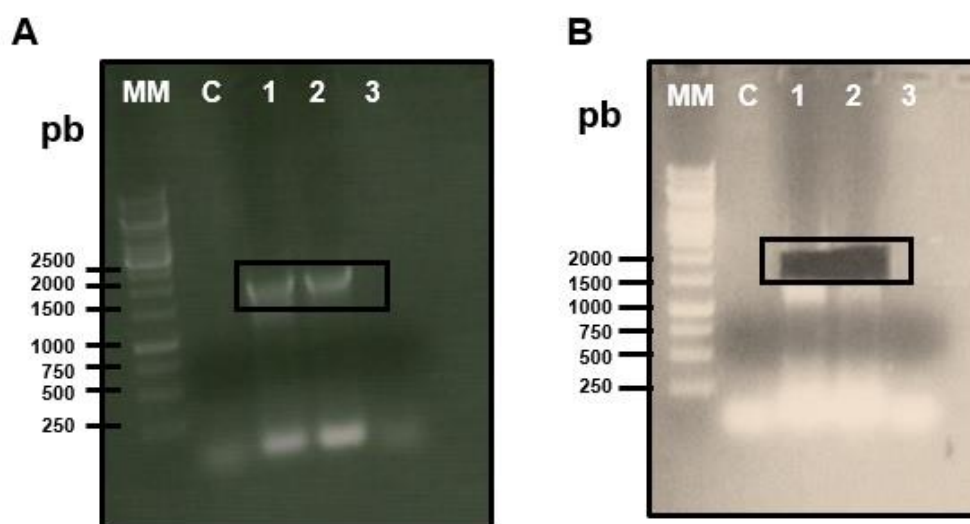


Figura 26 - Análise eletroforética das reações de PCR para a amplificação da região 5'UTR, a 59°C. Análise das reações de PCR por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder), C- Controle negativo (amostra sem DNA molde), 1, 2 e 3 - Produtos de PCR para amplificar a região 5'UTR. A) Imagem do gel antes da extração das bandas; B) imagem do gel após extração das bandas do gel.

Na figura 26A, verifica-se a presença das bandas com o tamanho esperado, procedendo-se ao corte e remoção das mesmas para extração do DNA. Pela análise da figura 26B, as bandas referentes ao produto de PCR foram removidas na totalidade. A extração do DNA ocorreu como esperado.

III.1.3 Amplificação do cDNA da Mob1

Para amplificar o cDNA da Mob1 a partir de cDNA previamente sintetizado, foram desenhados “primers” específicos (F – mob KO e R – mob KO), que amplificam um fragmento de DNA de 942pb. As condições de PCR encontram-se descritas no ponto II.2.4.2.2.

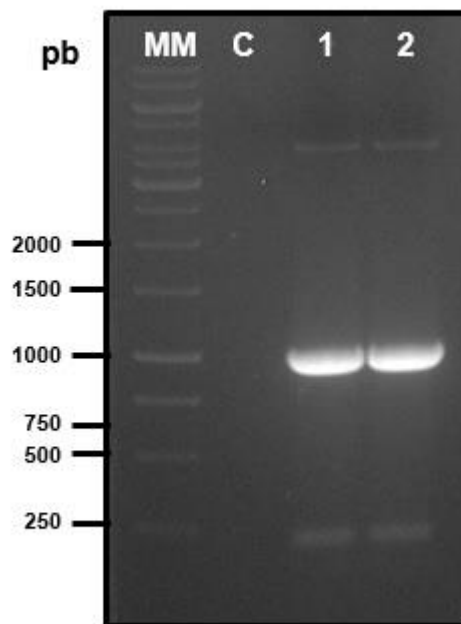


Figura 27 - Análise eletroforética das reações de amplificação do cDNA da Mob1. Após a reação de PCR analisou-se as amostras por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM – Marcador de massa molecular (O’GeneRuler 1kb DNA Ladder), C- Controlo negativo (amostra sem DNA molde), 1 e 2 - Produtos de PCR referentes ao cDNA da Mob1.

Verificou-se a presença das bandas com o tamanho esperado (942 pb, figura 27), procedeu-se ao corte e remoção das mesmas para posterior extração do DNA. O DNA foi extraído com sucesso.

III.2 Clonagem dos fragmentos no vetor KO de *T. gondii*

III.2.1 Clonagem do fragmento 3'UTR no vetor KO

Obtidos os fragmentos a clonar no vetor KO de *T. gondii*, procedeu-se à próxima fase: hidrolisar quer o fragmento 3'UTR quer o próprio vetor. Como descrito no ponto II.3, o primeiro fragmento a ser inserido na construção é o fragmento correspondente à região 3'UTR. Assim, foi feita a hidrólise do mesmo com os enzimas *NotI* e *MfeI* bem como do vetor. Feita a reação de ligação e após a transformação de bactérias competentes, fez-se um “colony PCR” para testar quais as colónias positivas, ou seja, quais os plasmídeos que tinham integrado o fragmento. Os “primers” utilizados no “colony PCR”, técnica utilizada para testar as colónias, foram os “primers” internos da região 3'UTR, F_3_int_mob e R_3_int_mob, estes “primers” permitem a amplificação de um fragmento de DNA de 698 pb. As condições de PCR estão descritas na tabela 9 do capítulo II.

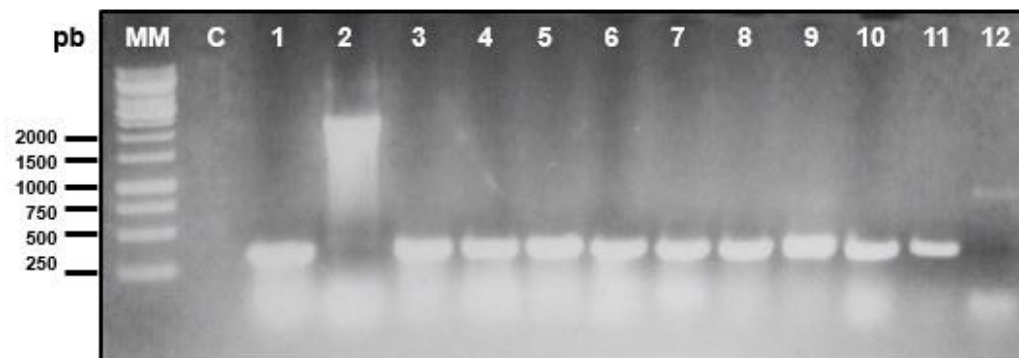


Figura 28 - Análise eletroforética das reações do “Colony PCR”, para a identificação do fragmento 3'UTR no vetor. Após o PCR as reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder). C- Controlo negativo (amostra sem DNA molde); 1-12 - Produtos de PCR.

Pela análise da figura 28, nenhuma das colónias era positiva, ou seja, não apresentavam um produto de PCR de 698 pb. Contudo, a fim de confirmar este resultado, selecionou-se 3 colónias (7, 8, e 9) e extraiu-se DNA plasmídico em pequena escala. Testou-se por hidrólise com o enzima *Sac-I* uma das colónias e se fossem

visíveis duas bandas de tamanho aproximadamente 2888 pb e 6051 pb, significaria que o plasmídeo tinha integrado o fragmento.

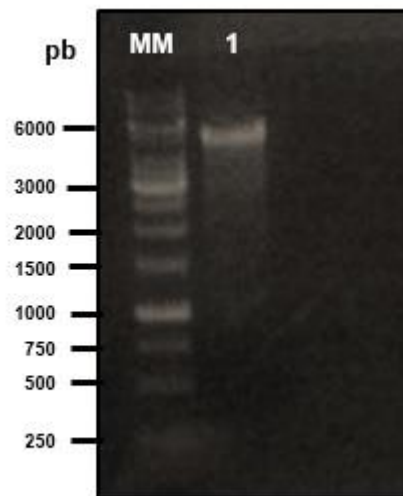


Figura 29 - Análise eletroforética da hidrólise do DNA plasmídico de uma colónia do vetor KO com a 3'UTR clonada (enzima SacI). Após a hidrólise do DNA plasmídico as mesmas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder). 1- Produto de Hidrólise com o enzima SacI.

Tal como esperado, devido aos resultados do “colony PCR”, a figura 29 mostra a presença de uma única banda que tudo indica ser o fragmento linear (~6900 pb), ou seja que o fragmento não foi integrado.

Das colónias selecionadas do gel referente à figura 20, preparou-se uma nova reação de hidrólise seguindo o mesmo procedimento para as três colónias selecionadas.

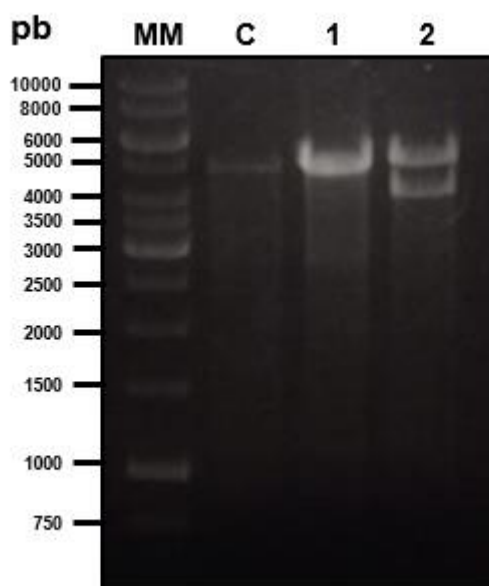


Figura 30 - Análise eletroforética para observação do produto de hidrólise do vetor KO com a 3'UTR das 3 colónias selecionadas com o enzima *SacI*. Após a hidrólise do DNA plasmídico as mesmas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder); 1 – produto de hidrólise proveniente da colónia 7; 2 - produto de hidrólise proveniente da colónia 8; 3 - produto de hidrólise proveniente da colónia 9.

A figura 30 mostra que as diferentes amostras parecem apresentar um padrão de bandas diferente. Aparentemente a amostra 3 parece ter um padrão de bandas coincidente com o tamanho do vetor com o fragmento 3'UTR (8940 pb).

III. Clonagem do fragmento 5'UTR no vetor

Para a inserção do fragmento 5'UTR no vetor, já com a 3'UTR previamente clonada, procedeu-se à hidrólise, quer do fragmento 5'UTR quer do vetor com a 3'UTR, com os enzimas *SpeI* e *BamHI*. Feita a reação de ligação e após a transformação de bactérias competentes, fez-se um “colony PCR” para testar quais as colónias positivas, ou seja, quais as construções que tinham inserido o fragmento. Os “primers” utilizados no “colony PCR” foram os “primers” internos da região 5'UTR, 5'UTR_Mob_F e 5'UTR_Mob_R, estes “primers” permitem amplificar um produto de 660 pb. As condições de PCR estão descritas na tabela 12 do capítulo II.

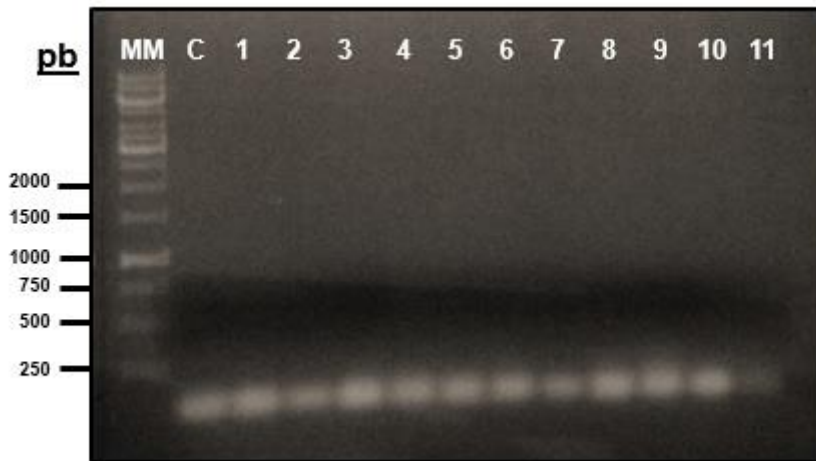


Figura 31 - Análise eletroforética das reações do “Colony PCR”, para a identificação do fragmento 5’UTR no vetor. Após o PCR as reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM – Marcador de massa molecular (O’GeneRuler 1kb DNA Ladder). C - Controlo negativo (amostra sem DNA molde); 1-11 - Produtos de PCR.

Não se obteve qualquer colónia positiva (figura 31), ou seja, o fragmento 5’UTR não foi integrado no plasmídeo. Continuou-se a verificar a ausência de colónias positivas e repetiu-se a hidrólise dos fragmentos obtidos a partir das colónias 8 e 9 (figura 30) com os enzimas *NotI* e *MfeI* para voltar a confirmar se o fragmento correspondente à região 3’UTR se encontrava no vetor.

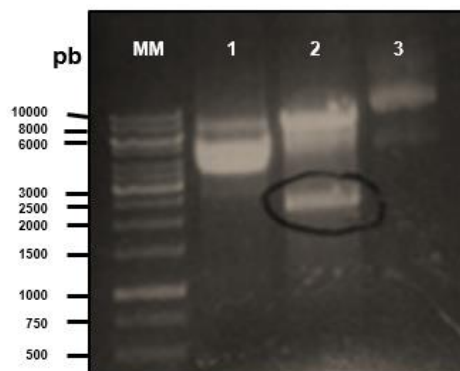


Figura 32 - Análise eletroforética para observação do produto de hidrólise do vetor KO com a 3’UTR das 3 colónias selecionadas com os enzimas *NotI* e *MfeI*. Após a hidrólise do DNA plasmídico as mesmas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM – Marcador de massa molecular (O’GeneRuler 1kb DNA Ladder); 1 – produto de hidrólise proveniente da colónia 8; 2 - produto de hidrólise proveniente da colónia 9; 3 - produto de hidrólise proveniente da colónia 9.

Na figura 32 pode verificar-se, no poço 2 referente ao produto de hidrólise do fragmento obtido a partir da colónia 9, a presença de uma banda com cerca de 2000 pb (3'UTR) e outra com cerca de 6940 pb (vetor KO). Com o intuito de perceber qual o motivo da falha na inserção do fragmento correspondente à região 5'UTR no vetor, testou-se em reações individuais a atividade dos enzimas *SpeI* e *BamHI*, no vetor KO com o fragmento 3'UTR.

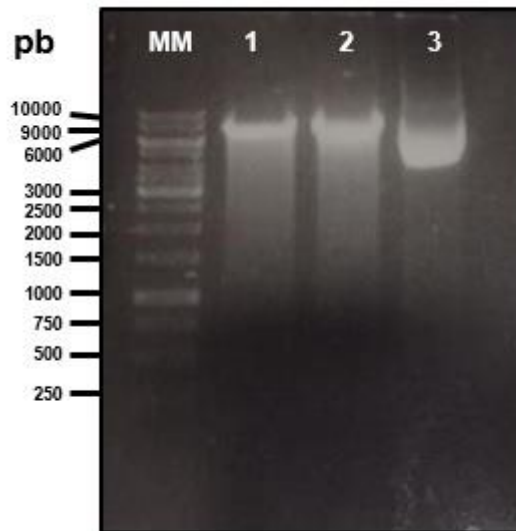


Figura 33 - Análise eletroforética para observação do produto de hidrólise do vetor KO com a 3'UTR das 3 colónias selecionadas com os enzimas *BamHI* e *SpeI*. Após a hidrólise do DNA plasmídico as mesmas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder); 1 – produto de hidrólise do vetor KO com a 3'UTR, com o enzima *BamHI*; 2 - produto de hidrólise do vetor KO com a 3'UTR, com o enzima *SpeI*; 3 – vetor não hidrolisado com a 3'UTR.

Na figura 33, pode-se observar a presença de uma banda na amostra 1 e 2 que corresponderá ao vetor KO com o fragmento 3'UTR (~8940 pb). Na tentativa de perceber se a falha na inserção do fragmento 5'UTR está na reação de hidrólise, preparou-se uma reação só com o enzima *BamHI*, outra com o enzima *SpeI*, uma reação de hidrólise inicial com *BamHI* com posterior adição de *SpeI* e, por fim, uma reação de hidrólise inicial com *SpeI* e posterior adição de *BamHI*, uma vez que após a primeira hidrólise o segundo enzima pode ter maior dificuldade em atuar na extremidade.

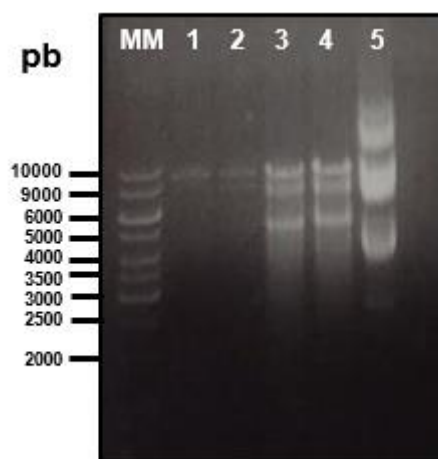


Figura 34 - Análise eletroforética para observação do produto de hidrólise do vetor KO com a 3'UTR das 3 colónias selecionadas com os enzimas *BamHI* e *SpeI*. Após a hidrólise do DNA plasmídico as mesmas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder); 1 – produto de hidrólise com o enzima *BamHI*; 2 - produto de hidrólise com o enzima *SpeI*; 3 – produto de hidrólise com o enzima *BamHI/SpeI*; 4 - produto de hidrólise com o enzima *SpeI/BamHI*; 5 - vetor não hidrolisado.

A figura 34 indica que os enzimas *BamHI* e *SpeI* estão a funcionar corretamente de forma isolada (poços 1 e 2 respetivamente) quando atuam uma depois da outra na mesma reação o padrão de bandas é igual independentemente do primeiro enzima a atuar (poços 3 e 4).

Foi feita nova reação de ligação com o fragmento correspondente à 5'UTR, transformação de bactérias competentes, e teste das colónias transformantes por “colony PCR”. Continuou-se a não detectar qualquer colónia positiva para a integração da 5'UTR pelo plasmídeo.

Foi feita nova reação de hidrólise só com o enzima *BamHI*, outra só com o enzima *SpeI*, novamente uma reação de hidrólise inicial com *BamHI* com posterior adição de *SpeI*, uma reação de hidrólise inicial com *SpeI* e posterior adição de *BamHI*, uma reação de hidrólise com os dois enzimas em simultâneo, uma reação com outro plasmídeo (*pIC 113*) com cada um dos enzimas em reações separadas, para o plasmídeo *pIC 113* com um tamanho de ~4850 pb. Desta forma voltaria a testar-te a eficácia dos enzimas não só com o vetor KO como num vetor que à partida se saberia ser hidrolisável pelos enzimas selecionados, servindo assim de controlo positivo para a atividade dos mesmos.

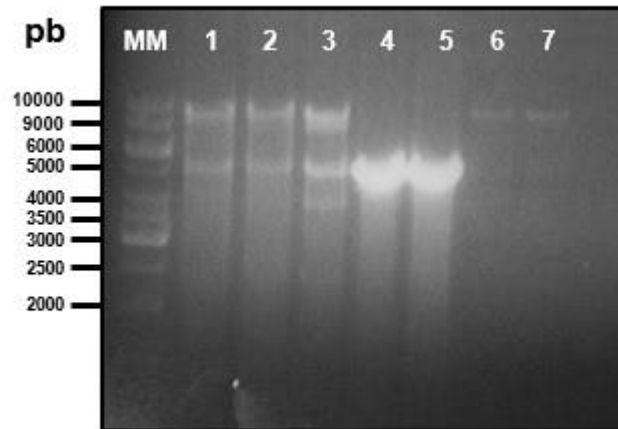


Figura 35 - Análise eletroforética para observação do produto de hidrólise do vetor KO com a 3'UTR e do vetor *pIC113* com os enzimas *BamHI* e *SpeI*. Após a hidrólise do DNA plasmídico as mesmas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM – Marcador de massa molecular (O'GeneRuler 1kb DNA Ladder); 1 – produto de hidrólise com o enzima *BamHI/SpeI*; 2 - produto de hidrólise com o enzima *SpeI/BamHI*; 3 – produto de hidrólise com os enzimas *BamHI/SpeI* em simultâneo; 4 – Produto de hidrólise do vetor *pIC113* com o enzima *BamHI* ; 5 - Produto de hidrólise do vetor *pIC113* com o enzima *SpeI*; 6 - produto de hidrólise do vetor KO com o enzima *BamHI*; 7 - produto de hidrólise do vetor KO com o enzima *SpeI*.

De facto após várias tentativas para testar a atividade dos enzimas, estes parecem estar a funcionar corretamente quer no vetor com a 3'UTR (poços 1, 2, 3, 6 e 7) quer noutra vetor (poços 5 e 6), dissipando a hipótese da atividade dos enzimas estar comprometida. Uma vez que após várias tentativas não se conseguiu inserir a região 5'UTR na construção do KO, preparou-se uma reação de sequenciação do vetor KO com a 3'UTR clonada a fim de perceber se a entrada deste fragmento no vetor causou alguma alteração na construção que, eventualmente, compromettesse a entrada do fragmento 5'UTR.

Capítulo IV

Discussão dos Resultados

Discussão dos Resultados

Os parasitas protozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa são agentes patogénicos responsáveis por diversas doenças. Apesar da grande biodiversidade deste filo, os mecanismos moleculares subjacentes ao processo de invasão das células hospedeiras parecem ser conservados entre diferentes espécies (Montoya *et al.*, 2004).

As proteínas envolvidas na regulação da replicação do parasita são excelentes alvos para controlar não só a formação de bradizoítos (forma de proliferação lenta do parasita) como a reativação de bradizoítos latentes, controlando assim o processo de infeção.

A proteína Mob1 de *T. gondii* parece estar envolvida no controlo da replicação do parasita, bem como no controlo do número de parasitas dentro do hospedeiro.

Estudos da proteína Mob1 em *T. gondii*, desenvolvidos pelo grupo, demonstram que a expressão da mesma é fortemente diminuída durante a replicação do parasita. Foi ainda criada uma estirpe de *T. gondii* a sobre expressar a proteína em fusão com a GFP e, após a análise do fenótipo replicativo, verificou-se um atraso significativo no processo de replicação do parasita, comparativamente à estirpe selvagem.

Com o objetivo de tentar perceber qual a influência desta proteína na replicação do parasita, iniciou-se a construção de um “knockout” condicional da Mob1 em *T. gondii*.

A construção do KO condicional, implica a substituição do gene selvagem por um flanqueado por locais de reconhecimento de uma recombinase. Esta substituição é feita por recombinação homóloga, logo a construção genética implica a obtenção de um clone com o cDNA da Mob 1 (a partir do cDNA de *T. gondii*) e com os braços de homologia da região 5' e 3' (a partir de DNA genómico).

A obtenção dos fragmentos para posterior inserção na construção foi feita por PCR, no caso dos braços de homologia a partir de DNA genómico de *T. gondii* e no caso do cDNA da proteína Mob1 a partir de cDNA sintetizado a partir de mRNA.

Definida a ordem de inserção dos fragmentos na construção para evitar que a clonagem dos três fragmentos crie novos locais de restrição no vetor, começou-se por amplificar a região 3'UTR. Contudo, este processo não foi imediato. Foram necessárias várias reações de PCR, com tentativas de otimização da reação com os “primers” específicos desenhados, foram desenhadas novas sequências de “primers” para amplificar aquela região e, apenas quando foi feito o cruzamento entre todas as sequências de “primers” desenhadas (Figura 1, capítulo II) e com gradiente de temperaturas é que se conseguiu obter o fragmento correspondente à região 3'UTR (figura 13, capítulo III). Tendo ocorrido esta dificuldade na obtenção do fragmento, foi feita a clonagem do mesmo num vetor específico para produtos de PCR para posterior sequenciação e, posteriormente, remover por hidrólise e clonar no vetor KO (figura 15, capítulo III). O fragmento seria removido do vetor por hidrólise para posterior clonagem no vetor KO, garantindo assim que o fragmento se encontra bem hidrolisado nas duas extremidades. Para garantir que o fragmento correspondia exatamente ao produto esperado, 2100 pb, e que não haviam quaisquer alterações do mesmo foi ainda feita reação de sequenciação, onde se veio a confirmar que de facto não só a sequência era a mesma como não foram identificadas quaisquer alterações.

Relativamente ao fragmento correspondente à região 5'UTR, a sua obtenção foi relativamente imediata (figura 17 e 18, capítulo III), sem grandes dificuldades, como se pode ver na figura 17.

Por fim, a obtenção do cDNA da Mob1 também foi rápida (figura 19), sem grandes dificuldades.

Após a obtenção dos fragmentos a clonar no vetor KO de *T. gondii*, foi feita a reação de hidrólise dos mesmos. Assim, começou-se por hidrolisar o fragmento correspondente à região 3'UTR e o vetor KO de *T. gondii* com os enzimas *NotI* e *MfeI* e posterior reação de ligação. Após a transformação de bactérias competentes testou-se as colónias com os “primers” internos da região 3'UTR, onde seria de esperar um produto com cerca de 698 pb. No entanto, como se pode observar na figura 20 do capítulo III, não se obteve nenhuma banda com esse tamanho ou seja, aparentemente nenhum plasmídeo teria integrado o fragmento correspondente à região 3'UTR. Testou-se mais colónias e repetiu-se a reação de ligação, permanecendo o padrão de ausência da banda esperada. Ainda assim, e uma vez que o padrão encontrado nos géis

de eletroforese analisados era o mesmo, foram selecionadas 3 colónias para preparar DNA plasmídico em pequena escala e posteriormente testar por hidrólise com o enzima *SacI* (figura 21 e 22, capítulo III). Pela análise dos géis, a colónia correspondente ao poço 9 parecia representar padrão de bandas esperado para um produto de hidrólise do vetor KO (6840 pb) com o fragmento 3'UTR (2100 pb).

Relativamente à clonagem do fragmento 5'UTR no vetor KO já com a região 3'UTR clonada, não foi concluída com sucesso. Após a hidrólise do fragmento com os enzimas *BamHI* e *SpeI*, e respetiva reação de ligação com o vetor, também aqui não se verificou a presença de quaisquer colónias positivas (Figura 23, capítulo III). Após inúmeras tentativas também se selecionou 3 colónias para extração de DNA plasmídico e posterior hidrólise, contudo não se observou nenhuma colónia positiva para a região 5'UTR. Na tentativa de perceber o que poderia estar a falhar na reação, testou-se por hidrólise o vetor KO com a 3'UTR com os enzimas *NotI* e *MfeI* para comprovar que o fragmento 3'UTR se encontrava mesmo na construção, e como se pode verificar na figura 24 na amostra 2, a banda referente aos 2100 pb parece estar presente. A atividade dos enzimas foi ainda testada individualmente (figura 25, capítulo III). Outra das hipóteses apontada para a falha da clonagem do fragmento 5'UTR seria um dos enzimas atuar primeiro e dificultar a atividade do segundo enzima na extremidade, ou seja um dos enzimas ser mais eficaz que o outro. Para esclarecer essa situação foi feita uma reação de hidrólise com um dos enzimas e só depois com o outro, e vice-versa, e através da figura 26 do capítulo III pode concluir-se que essa hipótese não se verifica. Estes enzimas foram ainda testados noutro vetor que não o KO, o pIC113 (4850 pb), e pela figura 27 confirma-se que de facto a sua atividade não estava comprometida. Foi ainda feita a sequenciação automática do vetor com o fragmento 3'UTR para tentar perceber se teria ocorrido alguma alteração na construção que pudesse comprometer a entrada do fragmento 5'UTR no vetor, mas os resultados não revelaram qualquer alteração.

Capítulo IV

Considerações finais e Perspetivas Futuras

Considerações finais e Perspetivas Futuras

Relativamente ao objetivo geral do trabalho, que visava a construção do clone que permitiria a obtenção de um “Knockout” condicional da Mob1 em *T. gondii*, este não foi cumprido na sua totalidade tendo ficado por completar a inserção do fragmento 5'UTR na construção e, posteriormente, o cDNA da Mob1.

Finda a construção o próximo passo seria a transfeção do DNA por eletroporação no *T. gondii*.

Numa última fase, o KO_Mob1 seria confirmado por PCR, os fenótipos caracterizados através da técnica de microscopia de fluorescência e Western blot.

Capítulo IV

Referências Bibliográficas

IV. Referências Bibliográficas

- Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP. (2001) *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert Rev Mol Med*; 1 - 19.
- Bardin, A.J. and Amon, A. (2001). Men and sin: what's the difference? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2, 815-826.
- Chow, A., Hao, Y. and Yang, X. (2010). Molecular characterization of human homologs of yeast MOB1. *Int. J. Cancer.* 126: 2079-89.
- Coppin, A., Varre, J.S., Lienard, L., Dauvillee, D., Guerardel, Y., Soyer-Gobillard, M.O., Buleon, A., Ball, S., Tomavo, S., (2005). Evolution of plant-like crystalline storage polysaccharide in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* argues for a red alga ancestry. *J. Mol. Evol.* 60, 257 – 267.
- Dubey, J.P., 1998. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *J. Parasitol.* 84, 862–865.
- Dubey. JP. (2004). Toxoplasmosis-a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol*; 126: 57-72.
- Tavares, A., Gonçalves, J., Florindo, C., Tavares, A.A. and Soares, H. (2012) Mob1: defining cell polarity for proper cell division. *J Cell Sci.* 15: 516-27.
- Gross, U., Bohne, W., Dubremetz, J.F. (1996). Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Today* 12, 30 – 33.
- Hammarton TC, Lillico SG, Welburn SC, Mottram JC. (2005). Trypanosoma brucei MOB1 is required for accurate and efficient cytokinesis but not for exit from mitosis. *Mol. Microbiol.* 56:104-16.
- Hergovich, A., Kohler, R.S., Schmitz, D., Vichalkovski, A., Cornils, H. and Hemmings, B.A. (2009). The MST1 and hMOB1 tumor suppressors control human centrosome duplication by regulating NDR kinase phosphorylation. *Biol.* 19:1692-702.
- Hou, M. C., Salek, J. and McCollum, D. (2000). Mob1p interacts with the sid2p kinase and is required for cytokinesis in fission yeast. *Curr. Biol.* 10, 619-622.
- Hu, K., Mann, T., Striepen, B., Beckers, C.J., Roos, D.S., Murray, JM. (2002). Daughter cell assembly in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biol. Cell.* 13, 593-606.
- Luca, F.C., Mody, M., Kurischko, C., Roof, D.M., Giddings, T.H. and Winey, M. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* Mob1p is required for cytokinesis and mitotic exit. *Mol. Cell Biol.* 21: 6972-83.
- Lüder CG, Campos-Salinas J, Gonzalez-Rey E, van Zandbergen G. (2010). Impact of protozoan cell death on parasite-host interactions and pathogenesis. *Parasit Vectors.*3: 116.

- Montoya, J.G., Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet* ; 363: 1965-1976.
- Kaczanowski S, Sajid M, Reece SE. (2011). Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. *Parasit Vectors*. 25;4:44.
- Ke. Hu, Johnson, J., Florens, L., Fraunholz, M., Suravajjala, S., DiLullo, C., Yates, Roos D. S. and Murray. J. M. (2006). "Cytoskeletal components of an invasion machine – the apical complex of *Toxoplasma gondii*" (cover) *PloS Pathogens*, 2(2): 0121-0138.
- Komarnitsky. P.B. (1998). ADR1-mediated transcriptional activation requires the presence of an intact TFIID complex. *Mol Cell Biol* 18(10):5861-7
- Kops, G.J., Foltz, D.R. and Cleveland, D.W. (2004). Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 101:8699-704.
- Remington, J.S., McLeod, R., Thulliez, P. & Desmonts, G. (2001). In: *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 5th ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 205-346.
- Remington, J.S., McLeod, R., Wilson, C.B., Desmonts, G. (2011). In: *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 7th ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 918 – 1041.
- Sabin, A.B., Feldman, H.A. (1949). Persistence of placentally transmitted toxoplasmic antibodies in normal children in relation to diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatrics* 4, 660 – 664.
- Salimova, E., Sohrmann, M., Fournier, N. and Simanis, V. (2000). The *S. pombe* orthologue of the *S. cerevisiae* *mob1* gene is essential and functions in signalling the onset of septum formation. *J. Cell Sci*. 113, 1695-1704.
- Tavares, A., Gonçalves, J., Florindo, C., Tavares, A.A. and Soares, H. (2012) Mob1: defining cell polarity for proper cell division. *J Cell Sci*. 15: 516-27.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol*. 30, 1217–1258.
- Ye, X., N. Nikolaidis, M. Nei, and Z.-C. Lai. (2009). Evolution of the mob gene family. *The Open Cell Signalling Journal* 1: 1-11.
- Zeng, Q. and Hong, W. (2008). The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals. *Cancer cell*. 13: 188-192.