



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



TIAGO WILSON PATRIARCA MINEO

O USO DE SISTEMAS DE EDIÇÃO GENÔMICA PARA AVALIAÇÃO DE
POTENCIAIS FATORES DE VIRULÊNCIA DOS PROTOZOÁRIOS
Neospora caninum E *Toxoplasma gondii*

UBERLÂNDIA – MG
2024

Tiago Wilson Patriarca Mineo

O USO DE SISTEMAS DE EDIÇÃO GENÔMICA PARA AVALIAÇÃO DE
POTENCIAIS FATORES DE VIRULÊNCIA DOS PROTOZOÁRIOS

Neospora caninum E *Toxoplasma gondii*

Tese apresentada à comissão
especial de avaliação para
promoção à classe de Professor
Titular da carreira de magistério
superior da Universidade Federal
de Uberlândia

Uberlândia, MG

2024

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M664u Mineo, Tiago Wilson Patriarca, 1979-
2024 O uso de sistemas de edição genômica para avaliação de potenciais fatores de virulência dos protozoários *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* [recurso eletrônico] / Tiago Wilson Patriarca Mineo. - 2024.

Tese (Promoção para classe E - Professor Titular) - Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Biomédicas.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2024.5048>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Professores universitários - formação. I. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-graduação em Biot Instituto de Ciências Biomédicasecnologia. II. Título.

CDU: 378.124

André Carlos Francisco
Bibliotecário Documentalista - CRB-6/3408

Tiago Wilson Patriarca Mineo

O USO DE SISTEMAS DE EDIÇÃO GENÔMICA PARA AVALIAÇÃO DE
POTENCIAIS FATORES DE VIRULÊNCIA DOS PROTOZOÁRIOS

Neospora caninum E *Toxoplasma gondii*

Tese apresentada à comissão
especial de avaliação para
promoção à classe de Professor
Titular da carreira de magistério
superior da Universidade Federal
de Uberlândia

Uberlândia, 09 de outubro de 2024

Prof. Marcelo Emílio Beletti (Presidente)

Instituto de Ciências Biomédicas, UFU

Prof. Anderson de Sá Nunes

Instituto de Ciências Biomédicas, USP

Profa. Angela Kaysel Cruz

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP

Profa. Walderez Ornelas Dutra

Instituto de Ciências Biomédicas, UFMG

Prof. Matias Pablo Juan Szabo (Suplente)

Faculdade de Medicina Veterinária, UFU

À minha família, a quem devo tudo e dedico este trabalho.

Agradecimentos

A todos os pós-docs, doutorandos, mestrandos e alunos de iniciação científica
que tive a honra de orientar ou supervisionar.

A todos os colegas docentes, que estão e que já foram lotados no
Departamento de Imunologia, ICBIM/UFU

A todos os técnicos-administrativos lotados no Departamento de Imunologia,
ICBIM/UFU.

Ao Departamento “Microbiology, Immunology and Molecular Genetics” (MIMG)
da David Geffen School of Medicine. UCLA, em especial ao Prof. Peter Bradley,
por viabilizar esta tese.

A todos aqueles que contribuíram para este estudo e para minha carreira
docente.

Muito obrigado.

“Não esmorecer para não desmerecer”

Oswaldo Cruz

RESUMO

Neospora caninum é um parasita de relevância veterinária, causando doenças graves em cães e distúrbios reprodutivos em ruminantes, principalmente bovinos, levando a grandes perdas econômicas. A estreita relação filogenética com *Toxoplasma gondii* e a falta de patogenicidade em humanos impulsionam o interesse da comunidade científica em usar *N. caninum* como modelo para estudar a virulência de *T. gondii*. Para possibilitar esta comparação, é importante desenvolver ferramentas moleculares eficientes para *N. caninum*, para ganhar precisão e economizar tempo em protocolos de edição genômica. O desenvolvimento da genética molecular aprimorou muito o estudo da biologia e da patologia associada aos parasitas do filo Apicomplexa. Embora as ferramentas moleculares sejam altamente desenvolvidas para *T. gondii*, *N. caninum* carece de ferramentas eficientes para edição genômica. Aqui, desenvolvemos cepas e protocolos básicos usando a cepa de referência genômica de *N. caninum* para permitir ensaios eficientes de knockout e knockdown neste modelo. Com auxílio dessas ferramentas, mapeamos o conteúdo das proteínas de grânulos densos de *N. caninum*, descrevemos proteínas exclusivas de *N. caninum*, bem como comparamos alvos com ortólogos em *T. gondii*, aplicando parasitos geneticamente alterados em modelos estabelecidos para se mensurar a relação parasito-hospedeiro, com a intenção de se observar as respostas imunes induzidas *in vitro* e *in vivo* e para buscar fatores de virulência que podem ser passíveis de intervenção comum.

PALAVRAS-CHAVE: *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, CRISPR/Cas9, Grânulos densos, Caspase, Macrófagos, Camundongos

ABSTRACT

Neospora caninum is a parasite of veterinary relevance, inducing severe disease in dogs and reproductive disorders in ruminants, mainly cattle, leading to significant economic losses. The close phylogenetic relationship with *Toxoplasma gondii* and the lack of pathogenicity in humans drive the interest of the scientific community in using *N. caninum* as a model to study the virulence of *T. gondii*. To enable this comparison, it is important to develop efficient molecular tools for *N. caninum*, to gain precision and save time in genetic manipulation protocols. The development of molecular genetics has greatly improved the study of the biology and pathology associated with parasites of the phylum Apicomplexa. Although molecular tools are highly developed for *T. gondii*, *N. caninum* lacks efficient tools for genetic manipulation. Here, we developed basic strains and protocols using the genomic reference strain of *N. caninum* to allow efficient knockout and knockdown assays in this model. Using these tools, we mapped the protein content of *N. caninum* dense granules, described proteins exclusive to *N. caninum*, and compared different targets with orthologs in *T. gondii*, applying genetically altered parasites in established models to measure the host-parasite relationship, with the intention of observing the immune responses induced *in vitro* and *in vivo* and to search for virulence factors that may be amenable to common intervention.

KEYWORDS: *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, CRISPR/Cas9, Dense granules, Caspase, Macrophages, Mice

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4. RESULTADOS.....	38
4.1. Preparação de linhagens-base e protocolos para a edição genômica de <i>N. caninum</i>	38
4.2. Modelo para ensaios de descoberta, localização e análise funcional de proteínas ortólogas de <i>T. gondii</i> e <i>N. caninum</i>	52
4.3. Proteínas ortólogas às Caspases estão envolvidas na resistência de <i>T. gondii</i> contra mecanismos de resistência do hospedeiro.....	72
5. DISCUSSÃO.....	93
6. CONCLUSÕES.....	100
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
ANEXO.....	113

1. INTRODUÇÃO

Neospora caninum e *Toxoplasma gondii* são agentes etiológicos da neosporose e toxoplasmose, respectivamente. São parasitos filogeneticamente relacionados, pertencentes ao Filo Apicomplexa, Família *Sarcocystiidae* e subfamília *Toxoplasmatinae*, assim como outros importantes coccídios de interesse médico veterinário como *Besnoitia*, *Isospora*, *Sarcocystis*, *Frenkelia* e *Hammondia*. Estes parasitos apresentam três estágios principais: Taquizoítos - forma de replicação rápida, presentes de forma disseminada durante a fase aguda das infecções; Bradizoítos - forma de replicação lenta, presentes no interior de cistos teciduais formados durante a cronificação das infecções em tecidos neurais e musculares; e Esporozoítos - formados durante a reprodução sexuada nas células intestinas de seus hospedeiros definitivos, contidos dentro de oocistos que possuem formato sub-esféricos, contendo dois esporocistos elipsoides, com quatro esporozoítas cada.

O *N. caninum* e *T. gondii* são parasitos que apresentam distribuição cosmopolita, com taxas de positividade sorológica variáveis obtidas em diferentes espécies. O isolamento e caracterização de *T. gondii* ocorreu simultaneamente no Brasil e Tunísia, sendo seu ciclo de vida sexuado descrito somente em 1970. Em contrapartida, o primeiro relato sobre *N. caninum* ocorreu na década de 1980, quando um grupo de pesquisadores noruegueses se deparou com filhotes de cães que desenvolveram paralisia progressiva e fatal. O quadro foi inicialmente diagnosticado como toxoplasmose, devido à similaridade dos sinais clínicos induzidos, contudo a ausência de reatividade sorológica para o parasito levou a questionamentos sobre o diagnóstico inicial. Posteriormente, as amostras de tecidos desta ninhada foram examinadas em conjunto com um estudo retrospectivo nos EUA, quando foram observadas diferenças morfológicas evidentes entre as formas encontradas e *T. gondii*.

Apesar de possuírem um alto grau de similaridade genética, *N. caninum* e *T. gondii* apresentam diferenças biológicas significativas, principalmente no que concerne os seus ciclos sexuais e virulência apresentada frente seus hospedeiros intermediários. A neosporose acomete principalmente cães,

bovinos, pequenos ruminantes e equinos, enquanto a toxoplasmose pode ocasionar graves sinais clínicos em uma ampla miríade de hospedeiros, incluindo seres humanos.

Os seus hospedeiros definitivos são carnívoros (*N. caninum* – canídeos; *T. gondii* – felídeos), e são inicialmente infectados pela ingestão de cistos teciduais presentes em tecidos musculares e do sistema nervoso central de hospedeiros intermediários previamente infectados. A ingestão destas formas de latência (cistos teciduais) por seus hospedeiros definitivos dá início aos ciclos de vida dos parasitos, por meio da infecção de células epiteliais do intestino delgado, com a formação de gametócitos masculino e feminino, os quais se fundem e formam os esporozoítos que compõe os oocistos, estruturas eliminadas nas fezes dos animais e responsáveis pela contaminação ambiental.

Os oocistos liberados tornam-se infectantes no ambiente por ação de variações de temperatura e umidade, contaminando fontes de água e alimentos. Após a ingestão pelos hospedeiros intermediários, os esporozoítos são liberados no lúmen intestinal após ação de pH ácido e enzimas gástricas, colonizando de forma ativa as células intestinais. Há então a interconversão de estágio parasitário, com a transformação em taquizoítos que possuem alta capacidade de replicação e infectam quaisquer células nucleadas, disseminando-se por todo o organismo do hospedeiro e ocasionando as diversas manifestações clínicas durante a fase aguda da infecção. No entanto, é necessário ressaltar que as infecções ocasionadas por ambos os parasitos são geralmente subclínicas, sendo o aparecimento de sinais clínicos correlacionado à alta virulência das cepas infectantes e/ou desregulação dos processos inflamatórios decorrentes.

Por ser um patógeno primário de cães, *N. caninum* pode causar doença clínica em animais de todas as idades. Contudo, há um maior número de relatos de casos de neosporose clínica em cães em seus primeiros meses de vida, sendo a doença mais severa em animais infectados congenitamente. Cadelas com infecções latentes podem transmitir congenitamente o parasito aos seus fetos por várias ninhadas consecutivas. Frequentemente, os cães nascem assintomáticos e desenvolvem sinais clínicos semanas ou meses após o

nascimento. É importante ressaltar que a transmissão congênita não necessariamente induz a doença clínica nos filhotes de uma ninhada, contudo há uma alta probabilidade de que os filhotes nasçam infectados pelo protozoário, portando a infecção por todas as suas vidas. Os sinais clínicos mais comuns encontrados em decorrência da neosporose são paresia ou paralisia dos membros posteriores com hiperextensão rígida, sendo estes possivelmente associados com contratura ou calcificação dos feixes musculares. Em adição, uma grande diversidade de sinais clínicos neuromusculares pode ser observada em decorrência da infecção, como: dificuldades em deglutição, paralisia da mandíbula, flacidez muscular com consequente quadro de atrofia e paralisia de nervos faciais, associados ou não com a presença de distúrbios gastrointestinais, dermatites, cardiomiosite e pneumonia.

É digno de nota que a doença clínica pode estar associada a quadros de imunossupressão sistêmica, induzida por predisposição genética, tratamentos com anti-inflamatórios esteroidais, quimioterapias e co-infecções. Tais condições, quando presentes em animais com infecções latentes, favorecem a reativação do parasito presente em cistos teciduais para formas de replicação rápida que colonizarão os tecidos musculares e nervosos dos cães e, se não controlada, também se expandirá para os demais órgãos torácicos e abdominais. No caso de infecções primárias, indivíduos imunossuprimidos simplesmente não conseguem debelar a proliferação parasitária, que coloniza rapidamente todos os tecidos vitais do animal. Em ambos os casos, os animais podem ser levados a óbito em questão de dias ou semanas.

A infecção por *N. caninum* em bovinos emergiu como uma das principais causas de aborto em todo o mundo e estimou-se que, no início da década passada, causaria mais de US\$ 1,2 bilhão em perdas anuais em todo o mundo (REICHEL *et al.*, 2013). Em algumas regiões, até 42,5% dos abortos bovinos são atribuídos a *N. caninum*. Os abortos não só reduzem diretamente o número de bezerros nascidos, mas também levam a perdas associadas à reposição e à perda de produtividade futura das vacas afetadas (CANTÓN *et al.*, 2022; NAYERI *et al.*, 2022). Em termos monetários, a neosporose custa à indústria de laticínios dos EUA aproximadamente 546,3 milhões de dólares por ano. Em algumas regiões

da Argentina, a neosporose foi identificada como a principal causa de aborto em bovinos leiteiros e a segunda principal causa em bovinos de corte, com perdas econômicas significativas.

O Brasil, é um importante criador e exportador de gado, sendo assim, a neosporose pode afetar a produção bovina, estando associada principalmente a abortos em bovinos, que afetam diretamente a produtividade e a eficiência reprodutiva dos rebanhos (MAIA *et al.*, 2023). Estudos realizados em diferentes regiões do Brasil mostram resultados com variações na soropositividade para *N. caninum*, com uma média geral entre 30 e 40%, mas com taxas encontradas entre 10 e 60% (ANDREOTTI *et al.*, 2010; BOAS *et al.*, 2015; MINEO *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2019).

A infecção por *T. gondii* em gatos, seu hospedeiro definitivo, é geralmente subclínica e restringe-se à eliminação de oocistos nas fezes. Tal eliminação de formas de contaminação ambiental pode estar ocasionalmente associada a fezes amolecidas e/ou presença de muco. Contudo, em gatos jovens infectados in útero ou sob imunossupressão, a toxoplasmose apresenta-se como uma doença multissistêmica, que não apresenta sinais patognomônicos, dificultando o diagnóstico clínico. A toxoplasmose pode ser traduzida clinicamente pela presença de febre, anorexia, vômito, diarreia, letargia, mialgia, dermatites, alterações oftálmicas (retinocoroidite, iridociclite, uveíte), miocardites e/ou desordens neurológicas, que podem levar o animal a óbito.

É amplamente descrito na literatura vigente que a primo-infecção confere proteção frente a futuros desafios, devido ao caráter perene do parasitismo tecidual. No entanto, estudos mais recentes sobre a diversidade de genótipos disponíveis do parasito contrariam esta teoria, devido a ampla gama de variações genéticas presentes entre os diferentes isolados parasitários, sendo esta característica especialmente observada no Brasil e demais países da América do Sul.

Os humanos são hospedeiros acidentais que podem contrair a infecção por *T. gondii* por diferentes vias. A infecção congênita foi inicialmente descrita em uma

criança (WOLF; COWEN; PAIGE, 1939) e posteriormente foi descoberto que ocorria em muitas espécies de animais, particularmente ovelhas, cabras e roedores (BEVERLEY, 1960). A toxoplasmose congênita é considerada uma importante antroponose mundial com índices relevantes de morbidade e mortalidade infantil. O parasito consegue atingir o feto pela via transplacentária, causando danos com diferentes graus de gravidade, dependente dos fatores de virulência do parasito, assim como da resposta imune da gestante e do período gestacional em que ela se encontra (GUIMARÃES *et al.*, 2022). Cerca de 85% dos recém-nascidos que foram acometidos pela infecção por esse parasito não apresentam sintomas ao nascerem. Recentemente, a Lei nº 14.154, sancionada em 26 de maio de 2021, ampliou o número de doenças rastreadas pelo teste do pezinho oferecido pelo SUS, que incluiu na Fase 1, além de seis doenças genéticas, a triagem para toxoplasmose congênita.

Nos humanos, via de regra, a transmissão vertical resulta na infecção congênita quando a mãe soronegativa sofre a primeira infecção durante a gestação (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; SCHWARTZMAN; MAFFIA, 1948), sendo que mulheres soropositivas antes da concepção geralmente não transmitem a infecção para o feto. Porém, há relatos de transmissão congênita, em que as mães adquiriram a infecção antes da gestação. Apesar da rara ocorrência, a transmissão congênita durante a fase crônica da infecção, pode acontecer em situações de imunossupressão, como em gestantes HIV+, sob uso de drogas imunossupressoras, ou quimioterapia (ANDRADE *et al.*, 2010; DESMONTS; COUVREUR, 1984; KODJIKIAN, 2010; MITCHELL *et al.*, 1990).

O diagnóstico preciso da neosporose e toxoplasmose requer ao clínico que se realize uma associação correta entre sinais clínicos apresentados, por meio de uma anamnese pormenorizada com ênfase no histórico alimentar, familiar e de ambiente, associando-se ao diagnóstico laboratorial de suporte.

Devido à pluralidade de sinais clínicos potencialmente induzidos por ambos os parasitos, a anamnese realizada de modo isolado não é suficiente para um diagnóstico definitivo, uma vez que outras patologias - infecciosas ou não - podem provocar sintomatologia semelhante. Neste sentido, exige-se diagnóstico

diferencial com as seguintes enfermidades, como: trauma, patologias de disco vertebral, neuropatias congênicas/hereditárias, doenças tromboembolíticas, neoplasias, envenenamento, miopatias metabólicas, distrofias musculares, miosites, miocardites, pneumonias, epilepsia e outros distúrbios neuromusculares idiopáticos, bem como outras doenças infecciosas.

Quanto aos exames laboratoriais de suporte, há a possibilidade de detecção direta ou indireta para ambos os parasitos. Quanto aos métodos de detecção direta, ensaios de imuno-histoquímica ou por reação em cadeia da polimerase (PCR) em biopsia de tecidos comprometidos. Adicionalmente, em associação a quadros clínicos de encefalomielite grave, preconiza-se a busca por formas parasitárias no sedimento celular oriundo do líquido cefalorraquidiano, também por meio de análise microscópica ou PCR. Faz-se necessário ressaltar que ambos os protozoários apresentam picos de parasitemia (presença de taquizoítos no sangue e plasma) extremamente curtos, tornando a busca direta em tais amostras inviável.

Quanto aos métodos de diagnóstico indireto destas infecções, utiliza-se tradicionalmente ensaios sorológicos com a intenção de se detectar anticorpos específicos para antígenos derivados de *N. caninum* e *T. gondii*. As técnicas comumente utilizadas para tal finalidade são a técnica de imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta e ensaios imunoenzimáticos (ELISA), geralmente voltadas para a detecção de anticorpos IgG antígeno-específicos. Entretanto, é necessário ressaltar que a reatividade sorológica nestes ensaios não determina a infecção clínica ou ativa: o resultado positivo indica que o animal entrou previamente em contato com antígenos do protozoário testado. Alguns kits de diagnóstico sorológico comercialmente disponíveis são voltados para a detecção de anticorpos IgM específicos aos antígenos derivados de *N. caninum* e *T. gondii*, sendo estes comumente encontrados nas fases agudas das infecções, proporcionando assim um maior indicativo sobre o estágio da infecção. Adicionalmente, é necessário ressaltar que, apesar destes ensaios serem quantitativos ou semi-quantitativos - permitindo assim a determinação da concentração relativa de anticorpos específicos para os antígenos testados – não há correlação real entre o volume de anticorpos séricos produzidos e o

estágio e/ou gravidade da doença clínica averiguada. Destaca-se que tais limitações destes ensaios são alvo de intensa investigação científica, sendo que uma vasta plêiade de ensaios sorológicos experimentais encontram-se em fase de desenvolvimento por grupos de pesquisa em todo o mundo, visando um diagnóstico mais acurado e, em consequência, auxiliando futuramente na resolução destas doenças parasitárias.

Atualmente, existem diferentes drogas preconizadas para o tratamento da neosporose ou toxoplasmose. De forma geral, sabe-se que o uso de bases farmacológicas anticoccidianas tem efeitos positivos nas infecções ativas, reduzindo a carga parasitária durante a fase aguda da infecção. Contudo, é necessário ressaltar que o efeito de medicamentos utilizados no tratamento destas protozooses não tem capacidade esterilizante, uma vez que acelera o processo de indução de latência das infecções e, adicionalmente, não são efetivos contra bradizoítos, protegidos no interior de cistos teciduais. Todavia, o tratamento adequado, utilizando bases isoladas ou em associação, potencializam as chances da resolução dos sinais clínicos observados durante o curso agudo das infecções.

No tratamento destas infecções que acometem principalmente o sistema nervoso central e musculatura, é importante que se tenha como alvo principal a redução da carga parasitária. Contudo, complicações inflamatórias decorrentes do processo replicativo do parasito nestes tecidos (neurite e polimiosite), bem como o processo de desidratação e comprometimento motor em determinados casos, devem ser levados em consideração no momento da escolha de um protocolo de tratamento. *N. caninum* e *T. gondii*, por apresentarem grandes similaridades biológicas, são alvo de protocolos de tratamento com bases farmacológicas semelhantes, diferindo basicamente em dosagens e particularidades dos hospedeiros infectados, sendo utilizadas isoladamente ou em associação sulfas, trimetopim, clindamicina e/ou pirimetamina. Atualmente, não há vacinas comercialmente disponíveis para estas infecções, com exceção de uma vacina viva atenuada para a prevenção de *T. gondii*, voltada exclusivamente para pequenos ruminantes da Grã-Bretanha, fazendo com que

a prevenção contra estas infecções sejam fundamentais para se evitar o aparecimento de doenças clínicas.

No contexto imunológico, sabe-se que a imunidade inata atua como primeira linha de ação contra agentes patogênicos e é um pré-requisito para indução da adequada da imunidade adaptativa. O reconhecimento imune inato é realizado por famílias de receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Apesar de amplamente abordado por diversos grupos de pesquisa para o modelo de *T. gondii*, os primeiros estudos avaliando os TLRs e as vias dependentes de MyD88 na infecção por *N. caninum* foram realizados por nosso grupo, quando demonstrou-se que tal via de sinalização inata era crucial para a ativação de uma resposta Th1 e consequente redução da carga parasitária durante as fases aguda e crônica da infecção.

Citocinas marcantes do perfil de resposta Th1 como IFN- γ e IL-12 são centrais na resposta imune contra *N. caninum* e *T. gondii*. IFN- γ , produzido principalmente por linfócitos NK e T, é vital para o controle do parasita, enquanto IL-12 produzido por células apresentadoras de antígeno estimula a produção de IFN- γ , promovendo uma resposta imune regulada e robusta. O TNF também desempenha um papel crucial no controle do parasita, como evidenciado em modelos experimentais.

A principal via de sinalização envolve o reconhecimento da profilina de *T. gondii* pelos receptores do tipo *Toll* (TLR) 11 e TLR12, resultando na produção de IL-12 por células dendríticas e macrófagos (BIERLY *et al.*, 2008; MASHAYEKHI *et al.*, 2011; PEPPER *et al.*, 2008; REIS E SOUSA *et al.*, 1997; ROBBEN *et al.*, 2004). A importância dos TLRs é demonstrada pela susceptibilidade de camundongos deficientes em MyD88, a principal proteína adaptadora envolvida na via de sinalização dos TLRs, durante a infecção por *T. gondii* (SCANGA *et al.*, 2002), assim como em *N. caninum* (MINEO *et al.*, 2009).

IL-12 estimula a produção de IFN- γ , inicialmente por células NK (GAZZINELLI *et al.*, 1993; HUNTER *et al.*, 1994) e posteriormente por linfócitos TCD4 e TCD8 (GAZZINELLI *et al.*, 1994; MINEO *et al.*, 2010; WILSON; MATTHEWS; YAP,

2008), sendo esta crucial para o controle da infecção. A sinalização do IFN- γ depende da fosforilação e translocação do transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (STAT1) para o núcleo, onde ocorre a indução de genes estimulados por interferon (ISGs), que eliminam o parasito por diversos mecanismos (DARNELL; KERR; STARK, 1994).

IFN- γ altera o metabolismo celular, induzindo a expressão de indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), que degrada triptofano, um aminoácido essencial para o crescimento dos parasitos (PFEFFERKORN, 1984). O IFN- γ também aumenta a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), que gera a produção de óxido nítrico, um metabólito altamente tóxico para o parasito, degradando arginina, outro aminoácido crucial para a sobrevivência do parasito (ADAMS *et al.*, 1990; BARROS *et al.*, 2019; MURRAY *et al.*, 1985). Recentemente, um dos tópicos de maior relevância na defesa do hospedeiro contra a infecção por *T. gondii* tem sido a análise dos mecanismos efetores induzidos por IFN- γ . Em camundongos, a família de proteínas ligantes de guanilato (GBPs) e as GTPases relacionadas à imunidade (IRGs) estão entre os genes mais fortemente regulados (MACMICKING, 2012; SASAI; PRADIPTA; YAMAMOTO, 2018).

Por outro lado, Nod2, um receptor originalmente descrito para peptidoglicanos de bactérias, com via de sinalização mediada por NF- κ B e MAPKs, tem sido implicado na geração de quadros inflamatórios exacerbados durante as infecções por ambos os protozoários, induzindo quadros clínicos deletérios aos hospedeiros (DAVOLI-FERREIRA *et al.*, 2016; DUTRA *et al.*, 2013). Hoje, sabe-se que outros NLRs estão envolvidos na indução da ativação do inflamassoma, um complexo multimérico de proteínas que é composto por caspases inflamatórias como, por exemplo, caspase-1 que, por sua vez, resulta no processamento e maturação de IL-1 β e IL-18, bem como na geração de piroptose. Esta ativação de caspase-1 em macrófagos foi demonstrado ser dependente de NLRP3, NLRC4 e ASC, que culmina na secreção de IL-1 β ativa, que está associado a um mecanismo de regulação por ROS e é responsável por induzir a produção de NO mediado por IL-1R e MyD88, sendo estas vias cruciais na restrição da replicação dos diferentes protozoários.

Conforme anteriormente relatado, *N. caninum* divide muitas características morfológicas e biológicas com *T. gondii*. Contudo, há especificidades marcantes e, enquanto para *T. gondii* há uma grande gama de publicações dedicadas a desvendar os mecanismos relacionados aos seus fatores de virulência e consequente indução de patogênese, estudos similares no modelo *N. caninum* são praticamente inexistentes. *T. gondii* e *N. caninum* são capazes de parasitar todas as células nucleadas do hospedeiro. Três organelas secretoras são essenciais para que estes protozoários desempenhem esta capacidade: micronemas, roptrias e grânulos densos. Proteínas secretadas por essas organelas que facilitam a invasão e alteram a fisiologia da célula hospedeira em favor dos parasitos. Concomitante com a invasão, os parasitos formam um vacúolo parasitóforo (PV) que os protege dos mecanismos imunes presentes no citoplasma e endossomo fisiologicamente formado.

Proteínas de roptrias (ROPs) e grânulos densos (GRAs) têm sido descritos por possuírem uma variedade de proteínas efetoras, induzindo um impacto direto sobre as vias de sinalização do sistema imune do hospedeiro. As ROPs, secretadas no citosol para sequestrar funções da célula hospedeira, incluem enzimas como quinases e fosfatases, que desativam mecanismos efetores da imunidade inata como os genes relacionados a imunidade relacionada-GTPases (IRGs), que agem na MVP para romper o que o parasito estabeleceu como um nicho favorável (LILUE *et al.*, 2013). Outras proteínas efetoras, como ROP16, são secretadas no citoplasma da célula hospedeira e que transita até seu o núcleo, onde induz espontaneamente a ativação de STATs (STAT-3 e STAT-6) e induzem o consequente bloqueio da produção de IL-12 (SAEIJ *et al.*, 2007). Após a invasão celular e consequente liberação das ROPs, inicia-se a secreção das GRAs no espaço vacuolar.

As GRAs são parte essencial na formação das membranas do PV, garantindo o ciclo lítico e manutenção de formas de latência. Inicialmente, julgou-se que as funções das GRAs fossem restritas a biogênese do vacúolo e maturação ou aquisição de nutrientes. Mostrou-se em *T. gondii* a primeira evidência que contradizia este racional, pela demonstração da atividade extra-vacuolar de

GRA15, que induz a ativação direta da subunidade p65 de NF- κ B, elevando a produção de IL-12, ou a ativação do inflamassoma via ASC em monócitos humanos (GOV *et al.*, 2013; SANGARÉ *et al.*, 2019). Gradativamente, começou-se a destacar outras proteínas com fenótipo semelhante, como GRA16, que se comporta como um ativador direto do fator de transcrição NFAT4 ou GRA24, que fosforila MAPK p38 α . Por outro lado, recentemente identificou-se novas GRAs (GRA17, GRA22, GRA23) que possuem atuação sinérgica para a indução de permeabilidade do VP, possibilitando ao parasito o acesso de pequenas moléculas e nutrientes (GOLD *et al.*, 2015).

Em contrapartida, pouco se sabe sobre as GRAs de *N. caninum*, sendo que menos de 10 destas proteínas foram descritas experimentalmente, ao passo que há trabalhos científicos sobre mais de 100 GRAs em *T. gondii*. Sabe-se que nem todas as GRAs de *T. gondii* possuem genes ortólogos em *N. caninum*, bem como não se pode inferir que todos os genes ortólogos possuirão comportamento biológico semelhante àquele descrito para *T. gondii*, uma vez que o grau de homologia entre as proteínas preditas é relativamente baixo.

Para se obter uma melhor compreensão da biologia destes parasitos, geralmente se empregam estratégias baseadas no desenvolvimento de um conjunto robusto de abordagens moleculares que permitem análises confiáveis de alvos genéticos específicos. Para análises funcionais, os métodos de genética reversa foram possibilitados pelo advento de protocolos de transfecção em vários modelos de Apicomplexa (DI CRISTINA; CARRUTHERS, 2018; SOETE; HETTMAN; SOLDATI, 1999). Este avanço levou ao desenvolvimento de uma série de ferramentas para manipulação genética destes parasitas. Essas ferramentas são mais bem desenvolvidas e mais fáceis de usar em *T. gondii*, que inclui uma variedade de promotores, marcadores de seleção, proteínas fluorescentes, estratégias de edição de genoma e abordagens de knockout e knockdown condicional (BOOTHROYD, 2020).

Para *N. caninum*, no entanto, este conjunto de ferramentas está substancialmente menos evoluída do que para o seu mais proeminente e intimamente relacionado protozoário, *T. gondii*. Embora protocolos de

transfecção para *N. caninum* estejam disponíveis há décadas, a maioria das abordagens genéticas aproveitou os vetores desenvolvidos especificamente para *T. gondii* (HOWE *et al.*, 1997; HOWE; SIBLEY, 1997). Embora essas ferramentas sejam úteis para a inserção estável de genes heterólogos de interesse (BECKERS; WAKEFIELD; JOINER, 1997; LEI *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2010), é necessário um maior desenvolvimento do modelo. Por exemplo, embora uma linhagem-base com uma mutação de ponto único no gene da hipoxantina-xantina-guanina fosforibosil transferase (*Nc1Δhxgprt*) tenha sido desenvolvida para se obter um marcador de seleção (COLLANTES-FERNANDEZ *et al.*, 2012; FRANCO *et al.*, 2016; FRANCO; SHASTRI; BOOTHROYD, 2014), ela foi gerada por mutagênese química, que provavelmente gerou muitas outras mutações, além de somente estar disponível em uma cepa que não possui genoma sequenciado.

HXGPRT tem sido utilizado com sucesso como marcador selecionável para transformação estável em *T. gondii* há mais de 20 anos, devido à sua segurança e versatilidade conferida pela seleção positiva ou negativa com ácido micofenólico/xantina (Mpa/X) ou 6-tioxantina (6TX), respectivamente (DONALD *et al.*, 1996). Outros marcadores selecionáveis disponíveis incluem cloranfenicol acetiltransferase (CAT) e uma versão mutada da diidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR) dirigida por promotores endógenos de *Toxoplasma* ou de *Neospora*. Esses marcadores têm sido efetivamente utilizados para inserções gênicas e marcação endógena, com base em estratégias de seleção utilizando resistência ao cloranfenicol e à pirimetamina, respectivamente (PEREIRA; BARONI; YATSUDA, 2014; PEREIRA; YATSUDA, 2014).

O advento de ferramentas de edição de genoma baseadas no sistema do gene 9 associado a repetições palindrômicas curtas regularmente inter espaçadas (CRISPR/Cas9) mudou drasticamente cada sistema em que foi desenvolvido. O sistema CRISPR/Cas9 foi adaptado para *T. gondii* (SHEN *et al.*, 2014; SIDIK *et al.*, 2014) e contribuiu para o campo ao promover a ruptura genética direcionada, rápida e precisa, marcação de epítomos endógenos e inserção específica de marcadores de seleção. Sem adaptação adicional, plasmídeos com componentes CRISPR/Cas9 usados em *T. gondii* foram usados

satisfatoriamente para inserir GFP em taquizoítos de *N. caninum* que expressam estavelmente o marcador fluorescente, bem como para depletar o gene NcGRA7 pela inserção de um marcador de seleção (ARRANZ-SOLÍS *et al.*, 2018). Desde então, plasmídeos pU6 - adaptados ou não com promotores de *N. caninum* - têm sido empregados para fusão de epítomos em alvos endógenos ou deleção de genes, especialmente daqueles que codificam proteínas de GRAs (DONG *et al.*, 2021; NISHIKAWA *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2020, 2021; YANG *et al.*, 2018). Essas estratégias normalmente utilizam de grandes flancos de homologia (mais de 800 pb) para reparo ou deleção dirigida por homologia por inserção de marcadores de seleção, o que representa uma clara desvantagem em comparação com o estágio de desenvolvimento do sistema CRISPR/Cas9 encontrado no modelo *T. gondii*.

A principal diferença no modelo de *Toxoplasma* é a combinação de um sistema CRISPR/Cas9 eficiente com o benefício da ausência do gene Ku80, permitindo assim uma recombinação altamente eficiente (FOX *et al.*, 2009; HUYNH; CARRUTHERS, 2009). O heterodímero Ku é conservado em eucariotos e é formado por duas subunidades, Ku70 e Ku80, que mantêm a integridade genômica através da ligação a quebras de fita dupla de DNA, fazendo reparos pela via de união de extremidades não homólogas (NHEJ) (WALKER; CORPINA; GOLDBERG, 2001). Na sua ausência, a integração aleatória é bastante diminuída, o que permite uma manipulação mais precisa dos *loci* alvo através de recombinação homóloga.

2. OBJETIVOS:

Objetivo Geral:

Elaborar ferramentas e definir modelos que propiciem o estudo comparativo da relação entre os protozoários *T. gondii* e *N. caninum* e seus hospedeiros.

Objetivos Específicos:

- 1) Gerar linhagens-base, conjunto de vetores e protocolos que facilitem a manipulação genética de *N. caninum*, aproximando o modelo dos padrões já definidos para *T. gondii*.
- 2) Descrever o conjunto de proteínas de grânulos densos de *N. caninum* tendo como base os ortólogos em *T. gondii*, realizando ensaios comparativos entre as espécies e estabelecendo um modelo de avaliação funcional destas moléculas quanto à sua participação nos processos relativos à infecção dos hospedeiros.
- 3) Descrever e caracterizar proteínas de *T. gondii* ortólogas às caspases, demonstrando sua participação na evasão contra mecanismos de resistência do hospedeiro.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Células hospedeiras e cultura de parasitas

Neospora caninum isolado Liverpool (NcLiv), bem como as linhagens RH Δ hxgprt Δ ku80 e PRU Δ hxgprt Δ ku80 de *T. gondii*, juntamente com os parasitos modificados neste estudo, foram mantidas em monocamadas confluentes de células de fibroblastos de prepúcio humano (HFF), cultivadas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco), 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, conforme descrito anteriormente (DONALD; ROOS, 1993; SOHN *et al.*, 2011).

Animais utilizados

Foram utilizados camundongos C57BL/6 de tipo selvagem, com 6-8 semanas de idade, obtidos e mantidos na Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em ambiente com temperatura e umidade controladas, com alimento e água *ad libitum*. Todos os procedimentos, manejo e cuidados foram realizados de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e mediante análise prévia e aprovação pelo Comitê de Ética de Utilização Animal da UFU (CEUA/UFU). Protocolo número 109/16.

Macrófagos murinos derivados de medula óssea (BMDM)

Camundongos C57BL/6 de 6 semanas foram eutanasiados por deslocamento cervical, e os fêmures e tíbias foram removidos e armazenados em meio RPMI. Em seguida, os ossos foram lavados com álcool 70% e as epífises foram cortadas. A medula óssea foi extraída lavando o interior dos ossos com meio RPMI 1640 incompleto utilizando uma seringa com agulha 26G. A suspensão celular obtida foi centrifugada a 400 x g por 10 minutos e, depois, ressuspendida em meio composto por RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e 30% de meio condicionado de células L929 (MARIM *et al.*, 2010). A seguir, as células foram incubadas em placas de Petri a 37°C e 5% CO₂. Após quatro dias de incubação, foi adicionado mais meio

R20/30 às placas, que foram então mantidas por mais 2 dias na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Completados os 6 dias de incubação, as células foram descoladas com PBS e a suspensão celular centrifugada a 400 x g por 10 minutos, sendo o pellet resultante ressuspensionado em RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. As células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas conforme o desenho experimental.

Análise *in silico* das proteínas de interesse

Todas as informações gerais sobre proteínas de interesse como sequências, essencialidade, localização genômica, perfil ortológico, entre outras, foram obtidas no ToxoDB (www.toxodb.org). Agrupamentos ortólogos de famílias evolutivas e expandidas das proteínas em estudo foram previstos pelo OrthoMCL (orthomcl.org) e Eukaryotic Pathogen, Vector and Host Informatics Resource (VEuPathDB, veupathdb.org), com base em sequências de aminoácidos. Usamos SignalP 6.0 (services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-6.0) para a previsão de peptídeos sinal e locais de clivagem das sequências e TMHMM Server v. 2.0 ([.dk/services/TMHMM/](http://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM/)) para a previsão de hélices transmembrana. A previsão da estrutura e/ou função dos alvos foi realizada no Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0 (PHYRE2, www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2).

Para detecção de repetições em tandem, utilizamos Rapid Automatic Detection and Alignment of Repeats in Protein Sequences (RADAR, www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/radar), juntamente com curadoria manual dos dados. A imunogenicidade de células B e as previsões de epítomos lineares foram obtidas no Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB, www.iedb.org), através das seguintes ferramentas: Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 (JESPERSEN *et al.*, 2017); Predição de Hidrofilicidade Parker (PARKER; GUO; HODGES, 1986); Previsão de acessibilidade de superfície Emini (EMINI *et al.*, 1985); e Previsão de Flexibilidade Karplus & Schulz (KARPLUS; SCHULZ, 1985). String (string-db.org) foi usado para a previsão de potenciais interações proteicas e análise de enriquecimento funcional.

Transformação de células competentes e seleção das colônias

Para a multiplicação e seleção de plasmídeos, cepas de *E. coli* competentes TOP10 foram transformadas por choque térmico com o plasmídeo previamente ligado ao fragmento de interesse. A solução contendo o plasmídeo ligado ao fragmento de interesse (5 µl) foi adicionado em 50 µl de bactérias competentes e mantidas em gelo por 10 minutos, posteriormente foi mantido a 42°C por 45 segundos. Em seguida foi acrescentado 150 µL do meio de cultura SOC (Invitrogen) e incubado a 37°C por 1 hora, sob agitação. Após a incubação todo o conteúdo foi plaqueado em meio de cultura LB com ampicilina (100 µg/mL, Sigma), e incubado a 37°C por 18 horas. Colônias isoladas foram selecionadas e inoculadas em tubos com 5 ou 50 mL de meio LB líquido e ampicilina (100 µg/mL), por aproximadamente 18 horas. Os plasmídeos foram extraídos das suspensões por minipreps.

Purificação de plasmídeos (Miniprep)

Os plasmídeos foram purificados pelo Kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific), conforme recomendações do fabricante. Resumidamente, a suspensão de bactérias transformadas foi transferida para um tubo e centrifugada a 10000 x *g* por 10 minutos. Após centrifugação, foi adicionado ao pellet 250 µl do tampão de ressuspensão e 250 µl do tampão de lise, e homogeneizado gentilmente por inversão, incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, neutralizado com 350 µl de tampão de neutralização e gentilmente homogeneizada até a formação do precipitado. O sobrenadante foi obtido por centrifugação a 10000 x *g* por 10 minutos, transferido para uma coluna de separação devidamente acondicionada em um tubo coletor, centrifugado por 2 minutos a 10000 x *g* e descartado o líquido. As colunas foram lavadas com 500 µl do tampão de lavagem, centrifugadas por 2 minutos a 10000 x *g*, e o processo repetido. Após descarte do tampão de lavagem, foi realizado uma nova centrifugação (10000 x *g*, 2 minutos) para retirada de qualquer resíduo do tampão de lavagem. As colunas foram transferidas para novos tubos, e foi adicionado 50 µl do tampão de eluição. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 10000 x *g*. As colunas foram descartadas e o material eluído contendo o plasmídeo armazenado a -20°C.

Fusão de epítomos em proteínas de interesse

Utilizamos a técnica de CRISPR/Cas9 para marcação endógena de genes de interesse com três epítomos de hemaglutinina derivada do vírus Influenza (3xHA) ou com múltiplos epítomos de HA arranjados em construção denominada “spaghetti monster”, conforme descritos anteriormente (NADIPURAM *et al.*, 2020a; VISWANATHAN *et al.*, 2015). Os oligonucleotídeos utilizados para este e outros fins estão listados na Tabela 1. Resumidamente, as sequências que codificam RNAs guia (gRNAs) foram ligadas ao plasmídeo pU6 Universal e preparadas juntamente com um produto de PCR do vetor pLIC:3xHA:DHFR com regiões flanqueadoras de 40 pb para recombinação na extremidade 3' de cada gene. A transfecção foi realizada em cubetas com intervalo de 2 mm com 400 µL de cytomix contendo 10^7 taquizoítos recém-lisados, 100 µg de cada construção e CaCl_2 (150 µM), usando pulsos únicos de 1,5–2,0 ms a 1,5 kV, 25 Ω e 25 µF em um eletroporador (Bio-Rad), conforme descrito anteriormente (SIDIK *et al.*, 2014).

Os parasitas foram então selecionados em meio contendo 1 µM de pirimetamina e clonados por diluição limitante. Os clones marcados foram selecionados por IFA utilizando o anticorpo monoclonal HA.11 (BioLegend). Anticorpos de coelho contra IMC6 e IMC12 de *T. gondii* foram utilizados para marcar a periferia dos parasitas. A eficiência da marcação de epítomos foi calculada contando os vacúolos positivos para HA versus vacúolos positivos para IMC6/IMC12 aos 14 dias após a transfecção. Pelo menos 100 vacúolos por cepa foram contados para determinar a porcentagem de parasitas marcados com sucesso.

Disrupção genética

A recombinação homóloga com o auxílio de CRISPR/Cas9 foi utilizada para deletar os alvos selecionados, conforme descrito anteriormente (NADIPURAM *et al.*, 2020a). Utilizamos um único gRNA para romper a região de codificação dos genes de interesse. Em adição, selecionamos sequências flanqueadoras nas regiões 5'UTR e 3'UTR para inserir um cassete de resistência contendo *HXGPRT* de *T. gondii* com promotor de *GRA7* de *N. caninum* (pJET1.2:p

NcGRA7 : TgHXGPRT) para substituição da região codificadora do gene pelo template de reparo.

Modificações reversíveis induzidas por auxina

Para produzir *N. caninum* expressando estavelmente o receptor de auxina da resposta do inibidor de transporte 1 (Tir1) de *Oryza sativa*, os plasmídeos originais gerados e otimizados por códon para *T. gondii* (pTgTUB1:OsTIR1-3xFLAG, TgSAG1:CAT) (BROWN; LONG; SIBLEY, 2018) foram adaptados para *N. caninum* por montagem via técnica de Gibson. Resumidamente, o promotor de *Toxoplasma TUB1* foi substituído pelo promotor *Neospora GRA7* (pNcGRA7). Além disso, o marcador selecionável utilizado também foi alterado para *TgHXGPRT* em vez de cloranfenicol acetiltransferase (CAT) utilizado na descrição original. Essas alterações geraram o plasmídeo pNcGRA7:OsTIR1-3xFLAG, TgSAG1:TgHXGPRT, utilizado neste trabalho. Os parasitas NcLiv $\Delta h\Delta k$ foram transfectados com esta construção linearizada, selecionada com Mpa/X, clonada por diluição limitante, e um clone foi escolhido com forte marcação citoplasmática com o anticorpo anti-Flag M2 (Sigma). O plasmídeo pTgTUB1:YFP-mAID-3xHA original, HXGPRT, contendo a sequência mAID para degradação proteasomal, foi alterado para a troca de seu marcador de seleção para DHFR, gerando o plasmídeo pTgTUB1:YFP-mAID-3xHA, DHFR (BROWN; LONG; SIBLEY, 2018). Para a depleção das proteínas de fusão AID, os parasitas foram tratados com 500 μ M de ácido indolacético (IAA, auxina) adicionado no momento da infecção durante os períodos de tempo especificados.

TABELA 1: Oligonucleotídeos utilizados neste estudo. Todas as sequências de primers são mostradas na orientação 5' a 3'.

#	Descrição	Sequência (5'-3')
P1	NCLIV_056045 tag homology flanks FWD	AGATCCGGTTGATGTTGATGATGTGCTCGATCTTGTGGAAGGAAGTGAGGACGGG AATT
P2	NCLIV_056045 tag homology flanks REV	TCAATTAGGCGAGCCTTCTTAGTCAGCGTGGCCAAGTGCACGGCCAGTGAATTGT AATA
P3	NCLIV_056045 tag gRNA FWD	AAGTTGGTCGAGTCGAAAATACCCAG
P4	NCLIV_056045 tag gRNA REV	AAAACTGGGGTATTTTCGACTCGACCA
P5	NCLIV_064150 tag homology flanks FWD	TTTAGTCCAGCAAGCAGAAACCATTTGGGAAAGCGAGAAGGGAAGTGAGGACGG GAATT
P6	NCLIV_064150 tag homology flanks REV	ATCCATAACGCGCCATGTAAACCTGCGCAACGGCATAACGACGGCCAGTGAATTGT AATA
P7	NCLIV_064150 tag gRNA FWD	AAGTTGCGTCTGCAACCCAATAGATG
P8	NCLIV_064150 tag gRNA REV	AAAACATCTATTGGGTTGCAGACGCA
P9	NCLIV_069360 tag homology flanks FWD	ACCCGTGACCAATGTGGAGAACGCAGTCCCACTGGGGAAGGGAAGTGAGGACGG GGAATT
P10	NCLIV_069360 tag homology flanks REV	AGTCCTTTTCCAATGATGGAACGGACTCGCGCTTTGTGACGGCCAGTGAATTGT AATA
P11	NCLIV_069360 tag gRNA FWD	AAGTTGCAATTCGGGATGCTGCTGCGG
P12	NCLIV_069360 tag gRNA REV	AAAACCGCAGCAGCATCCCGAATTGCA
P13	NCLIV_066730 tag homology flanks FWD	TACAGACGTCAAAATCTATGACCCACGGAGGCCAAGAAGGAAGTGAGGACGG GAATT
P14	NCLIV_066730 tag homology flanks REV	CTTGTAACTTTGGCGGTTTCGCACGTAGATGCTTCTACCGACGGCCAGTGAATTGT AATA
P15	NCLIV_066730 tag gRNA FWD	AAGTTGTCTGGGCACGGACTTGTGAG
P16	NCLIV_066730 tag gRNA REV	AAAACCTACAAGTCCGTGCCAGACA
P17	NCLIV_049870 tag homology flanks FWD	CTATCCGGCTCCTGCGCCGGTCACTTCGAGGAAGGCGCAGGAAGTGAGGACGG GGAATT
P18	NCLIV_049870 tag homology flanks REV	CAGTTCTCGCGCTACGGCGTTTCTCCATGCTCTGCCGCGACGGCCAGTGAATTGT AATA
P19	NCLIV_049870 tag gRNA FWD	AAGTTAGAGAACGCGAAAAGGACGTG
P20	NCLIV_049870 tag gRNA REV	AAAACACGTCCTTTTCGCGTTCTCTA
P21	NCLIV_038170 gRNA FWD	AAGTTGATAAGATCCTCTCTCTGGG
P22	NCLIV_038170 gRNA REV	AAAACCCAGGAAGGAGGATCTTATCA
P23	NCLIV_056045 KO 5'UTR homology flanks for PJET FWD	GCGGCCGCGCATCAGTAACAGACCGATAC
P24	NCLIV_056045 KO 5'UTR homology flanks for PJET REV	GAATTCGCGGAGATATGCACACAAATG
P25	NCLIV_056045 KO 3'UTR homology flanks for PJET FWD	GAATTCGCTACGCGATACCTCTACATA
P26	NCLIV_056045 KO 3'UTR homology flanks for PJET REV	GAGCTCGTTCCACAACCAAGTTAGCCT
P27	NCLIV_056045 KO gRNA FWD	AAGTTGCTTCTGATGAGTCTTGCGAG
P28	NCLIV_056045 KO gRNA REV	AAAACCTCGAAGACCTCATCAGAAGCA
P29	TgHXGPRT gRNA cleanup FWD	AAGTTGCCTCCCTGGTGGATTGGTCAG
P30	TgHXGPRT gRNA cleanup REV	AAAACCTGACCAATCCACCAGGGAGGCA
P31	NCLIV_069360 KO homology flanks FWD	TACCCTTTCTTGCCTGTGTAACCTGCTCACACGTGAGCCCACTCCATGGAACCTGA CTG
P32	NCLIV_069360 KO homology flanks REV	CACGATGTTTCGATGCAAGGGACCGAACAGTCGCCAGATCCCTGCAAGTGCATAGAA GGAA
P33	NCLIV_069360 KO gRNA FWD	AAGTTATAGTTAAGGGGTAGGCCATG
P34	NCLIV_069360 KO gRNA REV	AAAACATGGCCTACCCCTTAACATA
P35	NCLIV_066730 KO homology flanks FWD	TTTAGCTGTCACTTCCGAACTCTCGTTTCTTCCGCACCACTCCATGGAACCTGA CTG
P36	NCLIV_066730 KO homology flanks REV	CATGCCGTTTGTTCAGAGGACCGCGCACAGGAAGGCCTGCAAGTGCATAGAA AGGAA
P37	NCLIV_066730 KO gRNA FWD	AAGTTGCAGTCTGAGGAGACAGTCAG

P38	NCLIV_066730 KO gRNA REV	AAAACTGACTGTCTCCTCAGACTGCA
P39	Tir1_vector Gibson for promoter FWD	CGTCTCAGTGTCTCCTAAATGACCTACTTCCCTGAG
P40	Tir1_vector Gibson for promoter REV	AAGCTCTAGCTTATCGATAC
P41	pNcGRA7_insert Gibson FWD	GTATCGATAAGCTAGAGCTTCCACTCCATGGAACCTGAC
P42	pNcGRA7_insert Gibson REV	TTTAGGAGGACACTGAGACG
P43	Tir1_vector Gibson for marker FWD	CGAGAAGTAATTAATCACCGTTGTGCTC
P44	Tir1_vector Gibson for marker REV	GTTTGGACGCATGCATACTCGTCAAAAAAC
P45	TgHXGPRT_insert Gibson FWD	GAGTATGCATGCGTCCAAACCCATTGAAG
P46	TgHXGPRT_insert Gibson REV	CGGTGATTAATTACTTCTCGAACTTTTTCGCG
P47	NCLIV_056045 5' UTR check FWD	GATACTGCAGCTACGAAGCG
P48	pNcGRA7-TgHXGPRT check REV	GAAGTGTGCGAGACCTG
P49	NCLIV_056045 coding 1st exon check REV	GGATTGTTCGTTCTGCAGCTT
P50	NCLIV_056045 coding 3rd exon check FWD	TCGACTAAGTGTGCGTGAAT
P51	NCLIV_056045 coding 3rd exon check REV	CGTGTTCGGCGCATTTTCATC
P52	NCLIV_056045 3' UTR check REV	GAGACTGCATGTGCGTTAGAG
P53	NCLIV_069360 5' UTR check FWD	GAGTGATGGCCAAACGACG
P54	NCLIV_069360 coding check FWD	GAAGCCAAGCGCAGCATTG
P55	NCLIV_069360 coding check REV	CTGCCGCATATGTTGCTGG
P56	NCLIV_066730 5' UTR check FWD	CCTCAAAGTTCGTGCGTCTG
P57	NCLIV_066730 coding check FWD	CCCACGCAGAAAGTCAAGG
P58	NCLIV_066730 coding check REV	GGGAATTGGGACTGTTGGC
P59	TGME49_267740 tag homology flanks FWD	ACTGGATAAGCAGACTGCCTTCGGCACCTCACTTGATGACGGAAGTGGAGGACGG GAATT
P60	TGME49_267740 tag homology flanks VER	GGGGAACGCTACGAGTGAATCCATCAGCATAATATACACGACGGCCAGTGAATTGT AATA
P61	TGME49_267740 tag gRNA FWD	AAGTTGTCCGTTCTGAGAGTCGAGCG
P62	TGME49_267740 tag gRNA REV	AAAACGCTCGACTCTCAGGAACGGACA
P63	TGME49_267740 KO homology flanks FWD	TCGACTGTGTAGTTTTATCGGCTGCGAAAAAATTCAGTCCACTCCATGGAACCTGA CTG
P64	TGME49_267740 KO homology flanks REV	AAGAAGACATCCAGCAGTACCAGCGTCAATAACGCTACCTGCAAGTGCATAGAA GGAA
P65	TGME49_267740 KO gRNA FWD	AAGTTGGGCCGCATCGATAGGGTGGG
P66	TGME49_267740 KO gRNA REV	AAAACCCACCTATCGATGCGGCCCA
P67	TGME49_267740 5' UTR check FWD	GCATTCAGTAGCTAAGGGAAG
P68	TGME49_267740 coding check FWD	AATCGAGGTAACCGGCCTG
P69	TGME49_267740 coding check REV	TTGTTACGTCCTCCTTCCAG
P70	TGME49_215360 tag homology flanks FWD	ACTAAAAGAGCTAGAAAAAACACGGGTAACCGCGATACAGGAAGTGGAGGACGG GAATT
P71	TGME49_215360 tag homology flanks VER	GCAGCACCAAACATAGTTGCAGCTCTGAGGCGCTAAACGACGGCCAGTGAATTGT AATA
P72	TGME49_215360 tag gRNA FWD	AAGTTGCAGCTTACAGTGATCGTAAG
P73	TGME49_215360 tag gRNA REV	AAAACTTACGATCACTGTGAAGCTGCA
P74	TGME49_215360 KO homology flanks FWD	GTAACGATTTCCATTCTGTTATCCGGTACGTTTCGACGCCACTCCATGGAACCTGA CTG
P75	TGME49_215360 KO homology flanks REV	GAAGTGAAAGGCCGAAAAATTTCTGCTGCTGTTTCCCCTGCAAGTGCATAGAA GGAA
P76	TGME49_215360 KO gRNA FWD	AAGTTGATTGGGCAGCATATGCCGGG
P77	TGME49_215360 KO gRNA REV	AAAACCCGGCATATGCTGCCAATCA
P78	TGME49_215360 5' UTR check FWD	CCGATTGTTGACTGCTTAGTC

P79	TGME49_215360 coding check FWD	TCACGTTCCGGATGAATCTGT
P80	TGME49_215360 coding check REV	TTTAGCACGGTAGTTGCTGCC
P81	NCLIV_052280 tag homology flanks FWD	AGAGAACTAGTTGAGCTAGAAAGACTTACGGGTGATGAGGGAAGTGGAGGACGG GAATT
P82	NCLIV_052280 tag homology flanks REV	GAACGTTCTAGGTGCTGCATTTACCAGGTTAAACGTCGACGGCCAGTGAATTGTA ATA
P83	NCLIV_052280 tag gRNA FWD	AAGTTGGCGACGTCACAGTGACGAAG
P84	NCLIV_052280 tag gRNA REV	AAAACCTTCGTCACGTGTGACGTCGCCA
P85	TGGT1_206490 tag homology flanks FWD	CTTGGCCACTGGCCTTCTCGTCGGCTCTCTTCTCAACGACGGAAGTGGAGGACGG GAATT
P86	TGGT1_206490 tag homology flanks VER	GTCGGCTTCAGAAAAACGTCAGTGGAACGTCGTGGGTGCGACGGCCAGTGAATTGT AATA
P87	TGGT1_206490 tag gRNA FWD	AAGTTGAGCAGCAGAAGCAGGGCACGG
P88	TGGT1_206490 tag gRNA REV	AAAACCGTGCCCTGCTTCTGCTGCTCA
P89	TGGT1_206490 KO homology flanks FWD	TTGGCGCTTGGGTTGCGCTCTCGCCGAGTTCCTTTGAGCCACTCCATGGAACCTG ACTG
P90	TGGT1_206490 KO homology flanks REV	AGAGTTTTCTCTGTTGTCGCTCATCCCTCAGTGTCGCTTCCTGCAAGTGCATAGAAG GAA
P91	TGGT1_206490 KO gRNA FWD	AAGTTGCATGTGAAGCAGCGGTTGAG
P92	TGGT1_206490 KO gRNA REV	AAAACCTCAACCGCTGCTTCACATGCA
P93	TGGT1_278975 tag homology flanks FWD	AGGGGTTCTGTGAAATCGGGGAAACAGAGCTTCTTCTGTGGAAGTGGAGGACGG GAATT
P94	TGGT1_278975 tag homology flanks VER	CTTTCTGCATCAGGTCACTAGGTCATTGTGTCAGTTTTGACGACGGCCAGTGAATTGTA ATA
P95	TGGT1_278975 tag gRNA FWD	AAGTTGACCCACAGGAGGCGCTCTGTG
P96	TGGT1_278975 tag gRNA REV	AAAACACAGAGCGCCTCTGTGGGTCA
P97	TGGT1_278975 KO homology flanks FWD	TTTCTTTCGCTTTTCGATCTTTTCGCTCCTCAGTCGACACCACTCCATGGAACCTGA CTG
P98	TGGT1_278975 KO homology flanks REV	TCTACCATCACCAATGCTGGTTGGGAAGTTACAGTGGAACCTGCAAGTGCATAGAAG GGAA
P99	TGGT1_278975 KO gRNA FWD	AAGTTAGCGACGATGTGAACGAGTAGG
P100	TGGT1_278975 KO gRNA REV	AAAACCTACTCGTTTCACATCGTCGCTA
P101	TGGT1_243298 KO homology flanks FWD	AGTGTTCTCCCTGGCTGCAATTGTACTGTTCTGAGTCAACCACTCCATGGAACCTGA CTG
P102	TGGT1_243298 KO homology flanks REV	TTCTCTCGCTTCTTCTTACGCAGTCCTTCTAATTCTCCCTGCAAGTGCATAGAAG GAA
P103	TGGT1_243298 KO gRNA FWD	AAGTTGCGCCTGGCTGCCCTGTTCTG
P104	TGGT1_243298 KO gRNA REV	AAAACAGGAACAGGGCAGCCAGGCGCA
P105	TGGT1_206490 5' UTR check FWD	GTCTGTCTCATCCCCCGTT
P106	TGGT1_206490 coding check FWD	GTCTCCGCAACTCAGTGTTT
P107	TGGT1_206490 coding check REV	TCCTCTCACCTTGCTGGATC
P108	TGGT1_279875 5' UTR check FWD	GCATAGACGAGTGTTTTCGCT
P109	TGGT1_279875 coding check FWD	CATTCCGACAGTCTTCTCGC
P110	TGGT1_279875 coding check REV	CTCAGAATGTTGTGTCGTGTC
P111	TGGT1_243298 5' UTR check FWD	CCCTAGGAAACAGCTACTGTT
P112	TGGT1_243298 coding check FWD	CTGCAAGCCCAGAAGAACTAC
P113	TGGT1_243298 coding check REV	CCAAGTTGGCAGAATTGCGCT

Ensaio de placa

Placas de seis poços foram semeadas com monocamadas confluentes de HFFs e infectadas com aproximadamente 250 parasitas ($\pm 500 \mu\text{M}$ IAA) e deixadas formar placas por 6 dias para *T. gondii* e 8 dias para *N. caninum*. As monocamadas foram então fixadas em metanol a 100% durante 3 min, lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e coradas com violeta de cristal para visualização. O número de placas foi quantificado a partir das amostras e os ensaios de placas foram realizados em triplicata.

Ensaio de imunofluorescência (IFA)

Para IFAs, parasitos foram usados para infectar lamínulas contendo HFFs pelo tempo determinado para cada ensaio. No momento de interromper os experimentos, as lamínulas foram fixadas em formaldeído a 3,7%/PBS por 15 minutos, sendo posteriormente lavadas em PBS e bloqueadas e permeabilizadas em uma solução contendo PBS/soroalbumina bovina (BSA) a 3% e Triton X-100 a 0,2% por 30 min. As amostras foram então incubadas com anticorpos monoclonais de camundongo anti-HA (HA.11, BioLegend) e anti-IMC6 ou IMC12 produzidos em coelho diluídos em PBS, juntamente com BSA (3%) e Triton X-100 (0,2 %) por 1h. As amostras foram então lavadas em PBS e tratadas com anticorpos secundários específicos conjugados a AlexaFluor 594 ou 488, e diluídas 1:2000 em PBS/3%BSA/0,2%TX-100. Após um novo ciclo de lavagem, as lamínulas foram montadas em lâminas de microscópio com meio de montagem Vectashield (Vector Labs) contendo DAPI para a coloração de núcleos, e a fluorescência foi observada usando um microscópio Zeiss Axio Imager Z1. As imagens foram processadas via desconvolução utilizando o software Zeiss Zen.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Lisados de taquizoítos parentais e geneticamente modificados foram segregados por SDS-PAGE. A concentração final de acrilamida no gel de separação foi de 12%, consistindo de solução de 30% poliacrilamida e 0,8% bis-acrilamida, 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% SDS, 2 mM ácido etileno diamino tetra acético (EDTA), 0,125% N,N,N,N-tetrametil etileno diamino (TEMED) e 0,125% persulfato de amônio (APS). Após o gel de separação ter completado sua polimerização, foi

acrescentado à preparação o gel de empilhamento, contendo 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% SDS, 2 mM EDTA, 0,125% TEMED, 0,125% APS e acrilamida-bisacrilamida na concentração final de 5%.

Amostras das preparações testadas, bem como alíquotas de amostras de padrão de peso molecular de referência (Thermo Scientific), foram diluídas separadamente em tampão de amostra (0,1 mM Tris-HCl [pH 6,8], 4% SDS; 0,2% azul de bromofenol; 20% glicerol), e submetidas a aquecimento de 96°C por 5 minutos, e aplicadas individualmente, em volumes de 25 µL/poço para as amostras e 5 µL/poço para as amostras de referência de peso molecular. A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 20 mA, por aproximadamente uma hora. Após a migração eletroforética das preparações, o gel foi corado com solução de azul de Coomassie ou transferido em membrana de nitrocelulose para western blotting.

Western blotting (WB)

Após a separação eletroforética descrita acima, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (0,45 µm, Millipore, Bedford, EUA), utilizando sistema semi-úmido de transferência. O sucesso da transferência foi confirmado por visualização das frações do padrão de peso molecular sobre a membrana de nitrocelulose por meio de coloração com solução de Ponceau a 0,5%. A membrana foi bloqueada com PBS-T contendo leite desnatado (PBS-TM) a 5% por 1 hora à temperatura ambiente. Subseqüentemente, a membrana foi incubada com anticorpos primários diluídos em PBS-TM a 1% por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. Após seis ciclos de lavagens durante cinco minutos com PBS-T, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (HRP) diluído em PBS-TM a 1% por 1 hora à temperatura ambiente. Após novo ciclo de lavagens, a membrana foi revelada pela adição do substrato e visualizada em sistema de captura de imagem (BioRad). As massas moleculares aparentes das bandas foram estimadas a partir do padrão de peso molecular de referência.

Biotinilação por proximidade (BioID)

Os ensaios de BioID foram realizados conforme a descrição prévia (NADIPURAM *et al.*, 2020a). Em resumo, monocamadas de HFF foram infectadas com os parasitos NcLivGRA48-BirA, NcLivTgGRA24-BirA (MOTA *et al.*, 2016) ou controles parentais (NcLiv $\Delta h\Delta k$) por 24 horas a 37°C, com a adição de biotina (150 μ M). Após o período de incubação, as células foram desaderidas, lavados em PBS, lisados com tampão RIPA (50 mM Tris [pH 7,5], 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% deoxicolato de sódio, 1% NP-40) suplementado com o coquetel inibidor de proteases *Complete* (Roche) por 30 minutos em banho de gelo. Os lisados foram centrifugados a 14000 x g por 15 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante foi incubado com esferas ligadas a estreptoavidina (Pierce), a temperatura ambiente, por 4 horas. As esferas foram lavadas em tampão RIPA, e depois em tampão Ureia 8M (50 mM Tris-HCl [pH 7,4] e 150 mM NaCl).

As proteínas totais ligadas às esferas de estreptavidina foram reduzidas, alquiladas e digeridas conforme mencionado anteriormente (MOTA *et al.*, 2016; NADIPURAM *et al.*, 2020a). Em resumo, para a redução e alquilação, as esferas foram incubadas em 5 mM TCEP e 10 mM iodoacetamida à temperatura ambiente, no escuro, e com agitação constante a 1200 RPM por 20 minutos. As proteínas foram digeridas pela adição de 0,1 μ g de Lys-C e 0,8 μ g de tripsina a 37 °C, durante a noite. Em seguida, o volume das proteínas ressuspensas foi ajustado para uma concentração final de 5% com ácido fórmico. Para a análise por LC-MS/MS, as amostras foram dessalinizadas com C18 Tips (Thermo Scientific) e ressuspensas em 5% de ácido fórmico. A mistura de peptídeos foi fracionada em uma coluna C18 de 75 μ m e 25 cm, preenchida com partículas de C18 de 1,9 μ m, usando um gradiente de 140 minutos de acetonitrila crescente e eluída diretamente em um instrumento *Thermo Orbitrap Fusion Lumos*, onde os espectros MS/MS foram adquiridos por Aquisição Dependente de Dados (DDA).

A análise de dados foi realizada usando os algoritmos ProLuCID e DTASelect2, conforme implementado no *Integrated Proteomics Pipeline—IP2* (Integrated Proteomics Applications, Inc., San Diego, CA). As identificações de proteínas e peptídeos foram filtradas usando DTASelect, sendo necessário um mínimo de dois peptídeos únicos por proteína e uma taxa de falsos positivos a nível de

peptídeo inferior a 1%, conforme estimado por uma estratégia de banco de dados decoy.

Deteção de atividade do complexo do Inflamassoma

Para avaliar a ativação das caspase-1 e caspase-11, BMDMs não estimulados ou infectados com os diferentes parasitos foram incubados por uma hora com o reagente carboxyfluorescein FLICA (FAM-YVAD-FMK, Immunochemistry Technologies, LLC), como recomendado pelo fabricante. Após esse período, as células foram lavadas por cinco vezes com PBS/Soro albumina bovino (BSA) 2% e a aquisição das mesmas realizada em microscópio de fluorescência EVOS (Thermo) ou em leitor de microplacas (Molecular Devices).

Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Para a quantificação de ROS nos BMDMs infectados com parasitos parentais ou geneticamente modificados, foram plaqueados 1×10^6 /mL células em placas pretas de 96 poços com meio 10% de SFB. Uma vez que as células aderiram na placa, foram infectadas com taquizoítos em uma proporção de infecção de 1:1 (parasito:célula). Após 18 horas de infecção as células foram lavadas uma vez com PBS, e adicionado $5 \mu\text{M}$ da sonda DCFH-DA (Sigma) em meio DMEM sem vermelho de fenol (Gibco). Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, as células foram lavadas com PBS-BSA 2% e a fluorescência mensurada em microscópio de fluorescência EVOS (Thermo) ou em leitor de microplacas (Molecular Devices).

Quantificação de citocinas

Sobrenadantes de cultura de BMDMs foram utilizados para dosagem de citocinas IL-12p40, IL-10 e IL-1 β pela técnica ELISA tipo sanduíche, segundo o protocolo recomendado pelos fabricantes (BD Biosciences, R&D Systems). Em resumo, placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®) foram sensibilizadas com o respectivo anticorpo de captura *overnight* à 4°C. Após lavagem das placas com PBS-Tween e etapa de bloqueio de sítios inespecíficos, as amostras teste foram adicionados. Paralelamente, curvas padrões das respectivas citocinas murinas recombinantes foram realizadas em diluições seriadas em duplicata. Após incubação por 2 horas à temperatura

ambiente, as placas foram novamente lavadas e incubadas com o respectivo anticorpo de detecção biotinilados e conjugados com estreptavidina-peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente. Após o último ciclo de lavagem, as placas foram reveladas com a adição do substrato enzimático (tetrametilbenzidina [TMB], BD Biosciences). A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 450 nm e os valores de DO obtidos foram convertidos em pg/mL de acordo com a curva padrão.

Análises estatísticas

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o *software GraphPad Prism 10*. O método de Kaplan-Meier foi utilizado para estimar a porcentagem de camundongos sobreviventes em cada ponto após o desafio e as curvas de sobrevida foram comparadas usando o teste *log rank*. Diferenças entre os grupos em análise foram analisadas pelo teste paramétrico ANOVA ou teste *t* de Student ou teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, quando apropriado, utilizando o teste de comparação múltipla de Bonferroni ou Dunn, respectivamente, para examinar comparações entre pares de grupos selecionados. Todos os resultados foram expressos em média e desvio padrão, e considerados significativos para um nível de $p \leq 0,05$.

Normas de biossegurança

Todos os procedimentos, incluindo coleta, manuseio de materiais biológicos e dos reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis.

Todos os procedimentos utilizando animais de laboratório, incluindo habitação e bem-estar foram realizados em concordância com as recomendações do guia para pesquisas biomédicas envolvendo animais do Conselho Internacional para ciência animal de laboratório (ICLAS; *International Council for Laboratory Animal Science*), e assinado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA / UFU) é credenciado pela CONCEA (CIAEP: 23 01.0105.2014) e Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio; CQB: 163/02).

4. RESULTADOS

4.1. Preparação de linhagens-base e protocolos para a edição genômica de *N. caninum*

Conforme previamente publicado:

Efficient Gene Knockout and Knockdown Systems in Neospora caninum Enable Rapid Discovery and Functional Assessment of Novel Proteins

Tiago WP Mineo, Jessica H Chern, Amara C Thind, Caroline M Mota, Santhosh M Nadipuram, Juan A Torres, Peter J Bradley

mSphere, 2022, 7:e0089621. <https://doi.org/10.1128/msphere.00896-21>

Para auxiliar na manipulação genética de *N. caninum*, primeiro procuramos eliminar o marcador de seleção (cassete de resistência) *HXGPRT* utilizando CRISPR/Cas9 (Figura 1A). Para fazer isso, geramos sequências que codificam um RNA guia (gRNA) contra o *HXGPRT* de *N. caninum* (*NcHXGPRT*, NCLIV_038170) inseridos no plasmídeo universal pU6 e transfectados em taquizoítos 'selvagens' de *N. caninum* (SHEN *et al.*, 2014; SIDIK *et al.*, 2014). Parasitos geneticamente deficientes de *NcHXGPRT* foram selecionados negativamente com 6TX e clonados por diluição limitante, e foi escolhido um clone que não cresceu na seleção positiva (ácido micofenólico e xantina, Mpa/X). O sequenciamento da região codificante mostrou uma deleção de um único nucleotídeo no sítio alvo do gRNA, dentro do locus *HXGPRT*. Esta linhagem foi designada *NcLivΔhxgprt*.

Para melhorar a eficiência da recombinação homóloga na linhagem *NcLivΔhxgprt*, voltamos nossas atenções para o gene *Ku80* (NCLIV_056045), pois foi demonstrado que sua depleção melhorara drasticamente a recombinação em *T. gondii* (FOX *et al.*, 2009; HUYNH; CARRUTHERS, 2009). Primeiro, utilizamos CRISPR/Cas9 para adicionar uma etiqueta contendo três epítopos de hemaglutinina do vírus Influenza (3xHA) na região C terminal de

Ku80, acompanhado do cassete de resistência DHFR, que gerou parasitas com coloração nuclear conforme esperado (NcLivKu80-3xHA; Figura 1B).

Para depletar o gene *Ku80* na linhagem clonada de NcLivKu80-3xHA, geramos um gRNA contra o domínio barril beta de Ku80, com template de reparo dirigido por homologia às regiões flanqueadoras 5' e 3' de Ku80, clonadas ao redor de um cassete de seleção contendo HXGPRT de *T. gondii* (*TgHXGPRT*, Figura 1C). Estes foram transfectados e seleccionados, sendo que buscamos clones com ausência de marcação para Ku80. Um isolado foi selecionado e a correta substituição de *Ku80* por *TgHXGPRT* foi verificada por PCR (Figura 1D). Para melhorar a utilidade desta linhagem de *N. caninum* (NcLiv $\Delta ku80$ + *TgHXGPRT*) para futuras manipulações gênicas, utilizamos estratégia semelhante com um gRNA e utilização de recombinação homóloga para deletar *TgHXGPRT* do locus Ku80 por meio de seleção negativa (6TX; Figura 1E). A deleção de *TgHXGPRT* foi confirmada por PCR e a cepa sem *Ku80* e *HXGPRT* foi designada NcLiv $\Delta h\Delta k$ (Figura 1F).

Ku80 trabalha em conjunto com a proteína parceira Ku70 para facilitar a união de extremidades gênicas não homólogas (WALKER; CORPINA; GOLDBERG, 2001). Para avaliar se a depleção de Ku80 teve um efeito em seu parceiro, fusionamos 3xHA em Ku70 nos parasitas das linhagens NcLiv $\Delta hxgprt$ e NcLiv $\Delta h\Delta k$ (Figura 2A). O ensaio de imunofluorescência (IFA) de NcLiv $\Delta hxgprt$ (contendo Ku80) mostrou uma localização nuclear para Ku70, como esperado (Figura 2B). No entanto, nos parasitas da cepa NcLiv $\Delta h\Delta k$, a marcação de Ku70 foi drasticamente diminuída (Figura 2C) e em muitos parasitas era indetectável. O impacto da depleção de *Ku80* na expressão de Ku70 foi confirmado por Western blot, que mostrou uma ausência quase completa do sinal detectável (Figura 2D). Estes dados indicam que a depleção de *Ku80* resulta na concomitante desestabilização e degradação de Ku70.

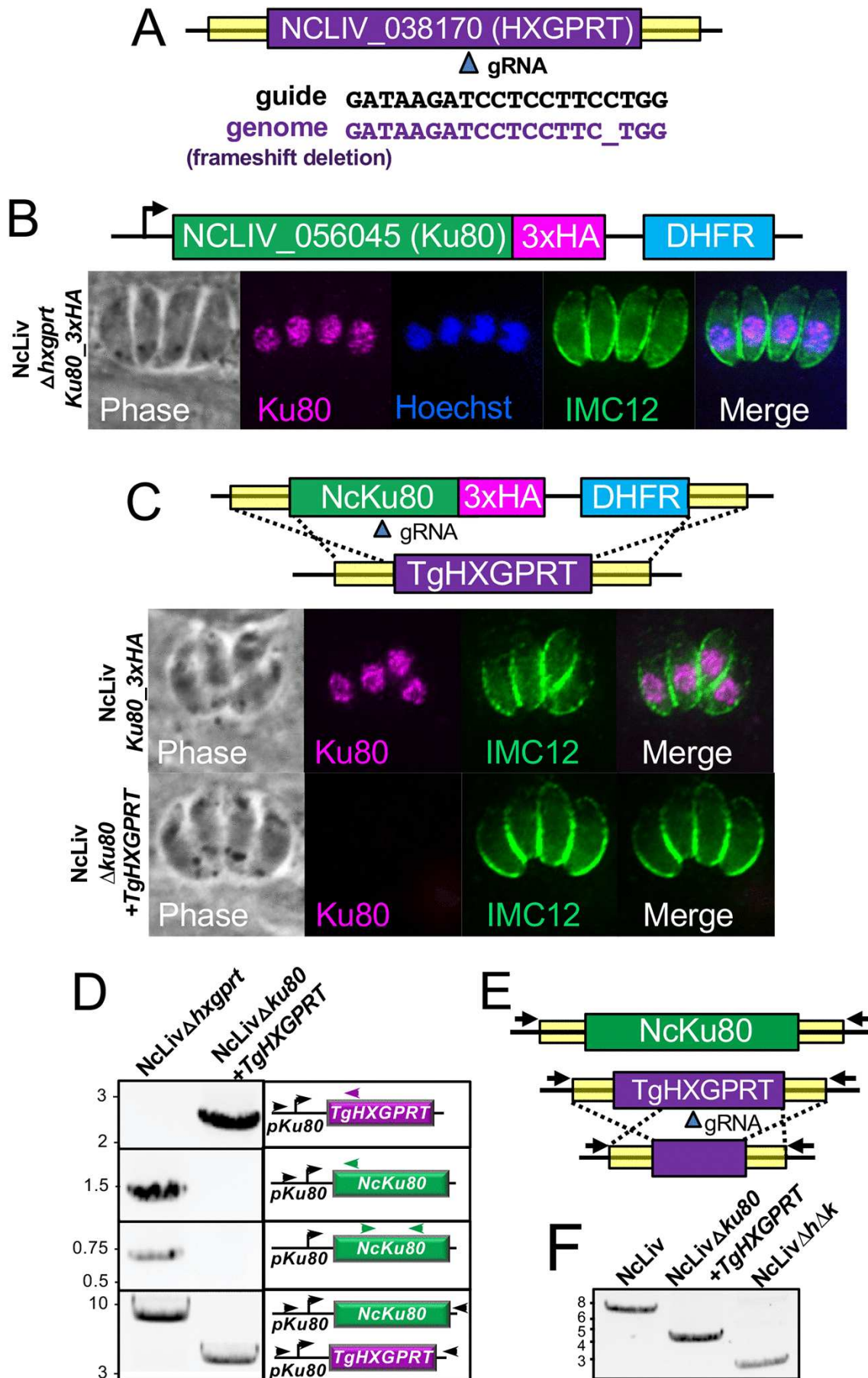


Figura 1: Depleção de *HXGPRT* e *Ku80* em *N. caninum*. (A) Diagrama mostrando CRISPR/Cas9 contra *HXGPRT* e a deleção resultante de um único nucleotídeo que torna os parasitas sensíveis a seleção por ácido micofenólico e xantina. (B) Esquema e IFA da fusão genética de etiqueta de 3xHA em *Ku80*. *Ku80* localiza-se no núcleo conforme sobreposição com a coloração nuclear por Hoechst, sendo a marcação de IMC12 utilizada para evidenciar a periferia dos parasitas. (C) Depleção de *Ku80* fusionado a 3xHA utilizando CRISPR/Cas9 e 'braços' de homologia contendo o cassete de resistência *HXGPRT*. IFA mostra a ausência na linhagem clonada de parasitos *NcLivΔku80* (+*HXGPRT*). (D) A verificação por PCR dos parasitos geneticamente deficientes de *Ku80* mostra que o cassete de resistência foi inserido no locus de *Ku80* e que a região codificante é eliminada no nocaute. (E) Diagrama e (F) verificação por PCR demonstrando a eliminação de *HXGPRT* utilizando a seleção negativa com 6TX para gerar parasitas sem *Ku80* e *HXGPRT* (linhagem denominada *NcLivΔhΔk*).

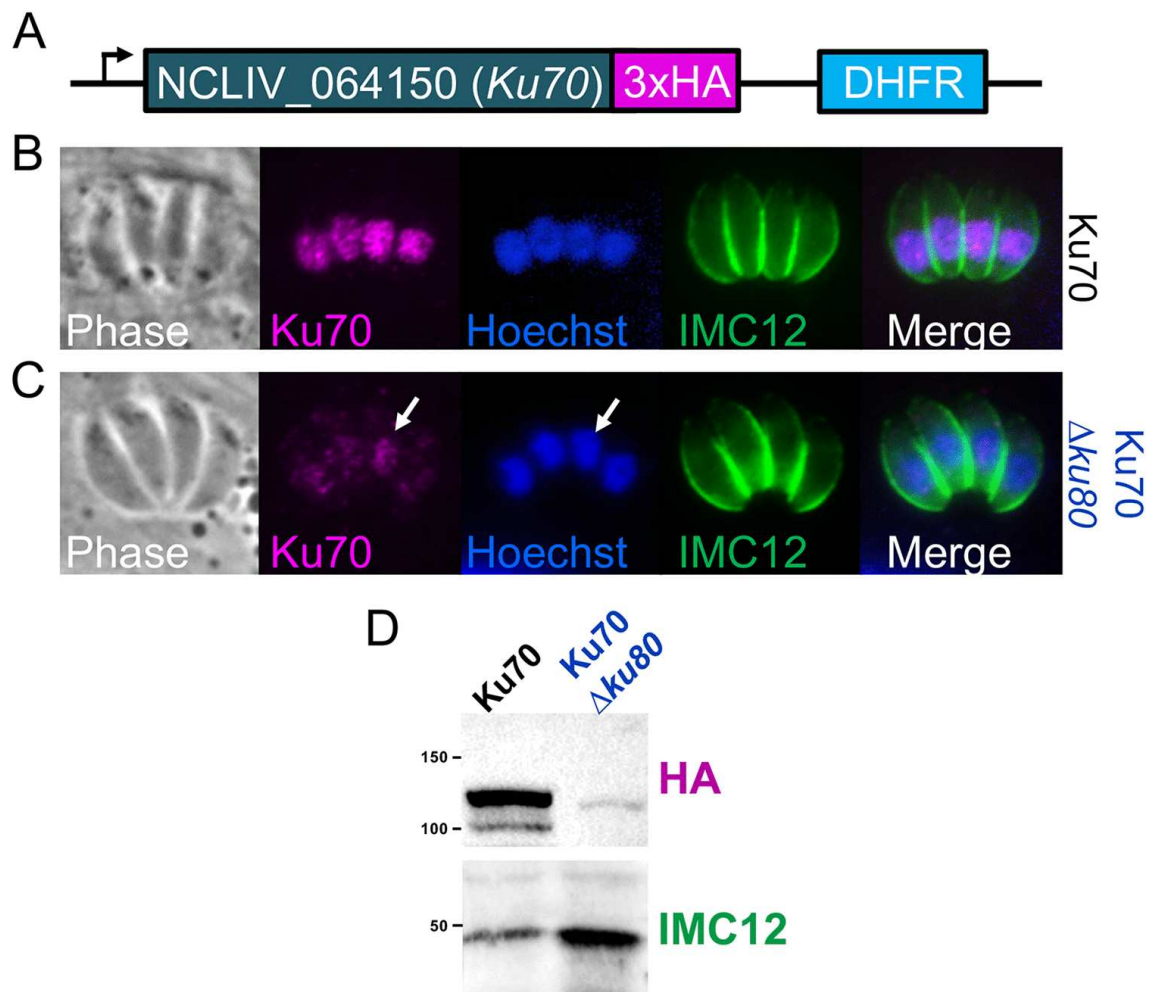


Figura 2: A depleção de Ku80 desestabiliza o seu parceiro Ku70. (A) Diagrama e IFA de Ku70 marcado (magenta) com e sem *Ku80*. Os parasitas foram corados com Hoechst (núcleo, azul) e anti-IMC12 (periferia, verde). (B) Western blot mostrando que Ku70 é drasticamente reduzido em parasitas sem *Ku80*. IMC12 é usado como controle de carregamento.

A depleção de Ku80 em *T. gondii* resulta em um aumento dramático na eficiência da fusão de epítomos por CRISPR/Cas9, devido ao aumento da taxa de eficiência na recombinação homóloga (HUYNH; CARRUTHERS, 2009). Para determinar se este também era o caso em *N. caninum*, comparamos a eficiência da fusão de epítomos em genes endógenos mediada por CRISPR/Cas9, em linhagens com e sem Ku80 (Figura 3). Selecionamos três genes para fusão com 3xHA: o ortólogo de *Neospora* da proteína GRA48 secretada por *T. gondii* (NcGRA48, NCLIV_069360), uma nova proteína específica de *Neospora* que contém um peptídeo sinal e uma série de repetições em tandem (NCLIV_066730; Figura 4), e uma nova proteína (NCLIV_049870) cujo ortólogo em *T. gondii* possui um 'CRISPR score' fortemente negativo (TGGT1_235420, -4,8), sugerindo que é essencial para a sobrevivência do parasito (Figura 3A).

Para a fusão dos epítomos, as linhagens NcLiv Δ hxgprt e NcLiv Δ h Δ k foram transfectadas com um gRNA para cada gene, bem como um template de reparo com regiões de 40 pb de homologia, como é utilizado em *T. gondii* (NADIPURAM *et al.*, 2020a). Como esperado, a marcação de NcGRA48 mostrou que esta proteína se localiza no vacúolo parasitóforo (Figura 3B). Da mesma forma, NCLIV_066730 também está localizado no vacúolo, indicando que esta é de fato uma nova proteína GRA específica para *Neospora* (Figura 3C). Até onde sabemos, NCLIV_066730 é a primeira proteína GRA específica de *Neospora* que foi identificada e, portanto, a nomeamos proteína GRA 1 específica de *Neospora* (NSG1) para diferenciá-la das outras proteínas GRA com ortólogos na família. Em contraste, NCLIV_049870 foi localizado no núcleo do parasita por IFA (Figura 3D). Em cada caso, a eficiência da marcação aumentou dramaticamente, de cerca de 20% com a presença de Ku80 para até 95% de eficiência na fusão com 3xHA em parasitas Δ ku80 (Figura 3E). Estes dados indicam que a linhagem-base NcLiv Δ h Δ k melhorou significativamente a recombinação homóloga, confirma a localização de grânulos densos para NcGRA48 e identifica duas proteínas completamente novas em *N. caninum*.

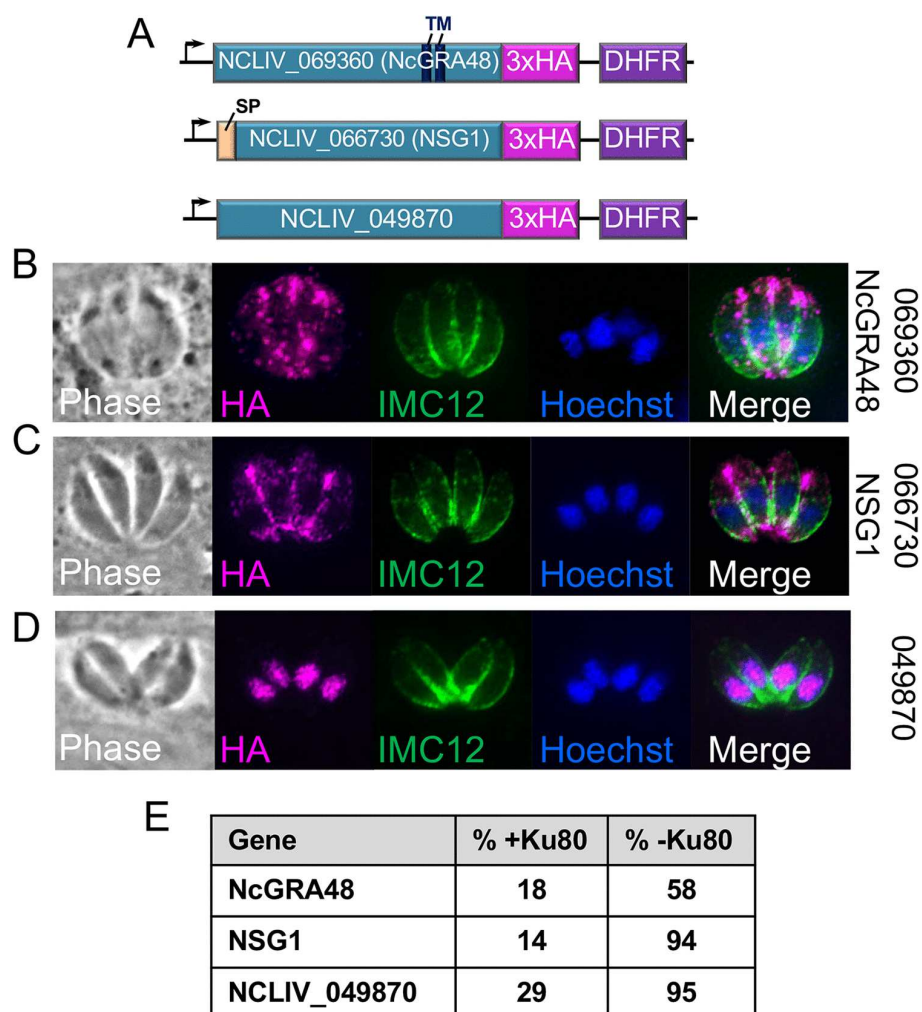


Figura 3: A marcação genética eficiente mediada por CRISPR/Cas9 em parasitas *NcLivΔhΔk* identifica novas proteínas secretadas e nucleares. (A) Diagrama do modelo genético de marcação endógena de NCLIV_069360/NcGRA48, NCLIV_066730/NSG1 e NCLIV_049870. GRA48 contém dois domínios transmembrana (TM) e NCLIV_066730 contém um peptídeo sinal (SP). Os modelos não são desenhados em escala. (B) IFA mostrando que NcGRA48 se localiza no espaço vacuolar ao redor dos parasitas, como esperado para uma proteína de grânulos densos. O IMC12 foi utilizado para marcar a periferia dos parasitas e a coloração Hoechst para detectar o núcleo do parasita. (C) IFA mostrando que NCLIV_066730 fusionado com 3xHA localiza-se no vacúolo. (D) IFA mostrando que NCLIV_049870 se localiza no núcleo do parasita, conforme mostrado pela colocalização com coloração Hoechst. (E) Diagrama mostrando a frequência de marcação genética endógena com e sem *Ku80*.

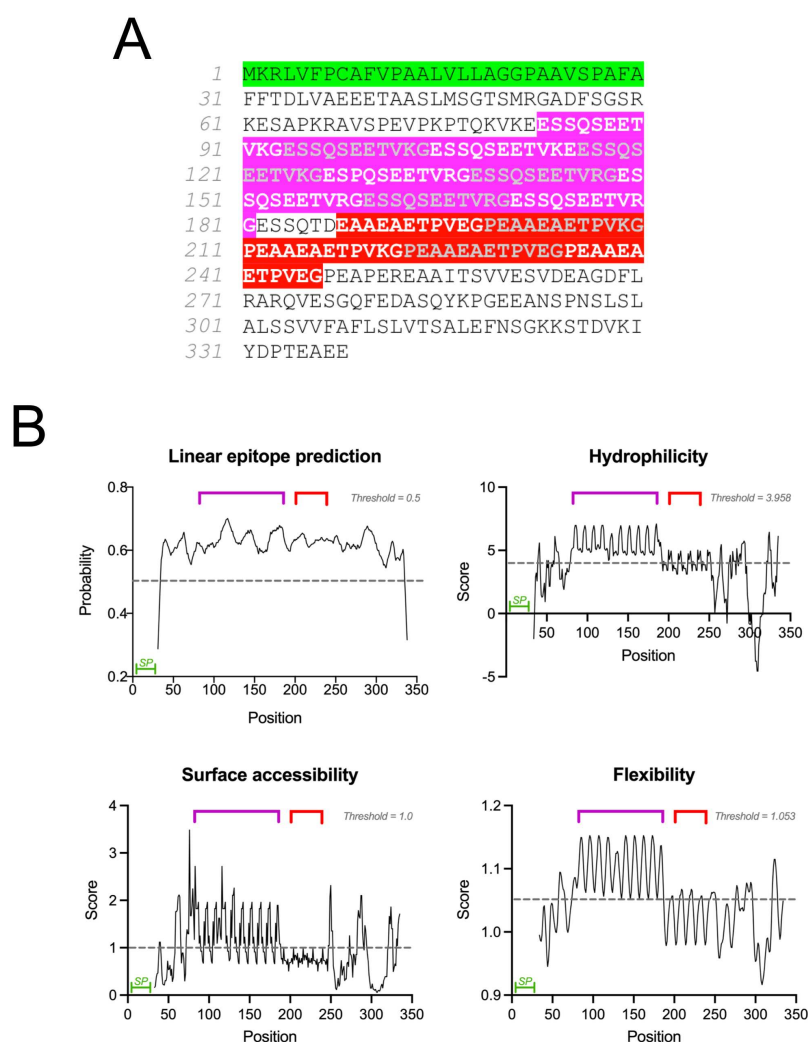


Figura 4: Características da sequência proteica de NCLIV_066730/NSG-1. (A) Sequência de aminoácidos de NCLIV_066730/NSG1, com destaque para o peptídeo sinal predito (verde), bem como uma série de repetições (rosa e vermelho) na proteína madura. As repetições foram identificadas usando o localizador de repetições de proteínas RADAR e curadas manualmente. (B) A presença de epítomos de anticorpos foi prevista usando quatro algoritmos diferentes no Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB), como segue: Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0; Predição de Hidrofilicidade Parker; Previsão de acessibilidade de superfície Emini; e Previsão de Flexibilidade de Karplus & Schulz.

Em *T. gondii*, a ausência de Ku80 permite deleções de genes inteiros mediadas por CRISPR/Cas9 com alta eficiência, utilizando um gRNA direcionado ao gene de interesse em adição a um template de reparo contendo um cassete de resistência dirigido por homologia de 40 pb nas regiões promotoras (BACK *et al.*, 2020; NADIPURAM *et al.*, 2020b). Na ausência de uma linhagem deficiente em Ku80 em *N. caninum*, demonstrou-se que os nocautes requerem regiões de homologia flanqueadoras muito mais extensas (WANG *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2018).

Nossas tentativas de depleção gênica utilizando flancos de homologia com 40 pb em uma linha positiva para Ku80 geraram genes interrompidos pela inserção do cassete contendo o marcador selecionável dentro da região de codificação do GOI, em vez das deleções genéticas completas desejadas (dados não mostrados). Para determinar se deleções precisas de genes poderiam ser obtidas em parasitas NcLiv $\Delta h\Delta k$, tentamos depletar NcGRA48 e NSG1 nas cepas com epítipo fusionado, utilizando a abordagem de inserção de reparo contendo *TgHXGPRT* (Figura 5). Como previsto, fomos capazes de interromper eficientemente ambos os genes, como mostrado pela falta de coloração para 3xHA (Figuras 5Ae 5B). Em seguida, verificamos por PCR que todo o gene foi devidamente excluído e substituído por *TgHXGPRT* (Figura 5C a 5E). Estes dados demonstram que deleções de genes inteiros podem ser facilmente obtidas em parasitas NcLiv $\Delta h\Delta k$ usando regiões flanqueadoras mínimas, semelhantes às observadas em *T. gondii* (NADIPURAM *et al.*, 2020a).

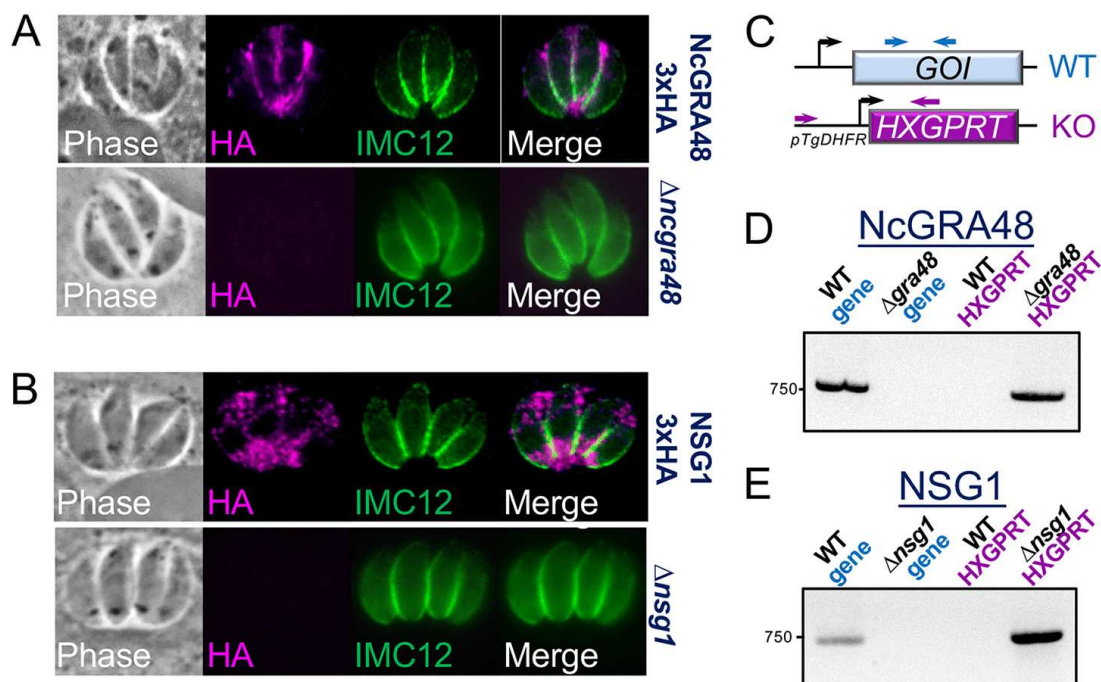


Figura 5: A deleção de Ku80 permite a depleção gênica eficiente com regiões flangeadoras mínimas para reparo direcionado por homologia. (A, B) IFA mostrando que as estratégias de exclusão eliminaram a etiqueta 3xHA das linhagens NCLIV_069360/*NcGRA48* e NCLIV_066730/*NSG1*. IMC12 é usado para corar a periferia dos parasitas. (C) Diagrama mostrando estratégia para PCR verificar as deleções do gene de interesse (GOI) em parasitas *NcLiv* $\Delta h\Delta k$. (D, E) Análises em gel de agarose dos nocautes genéticos mostrando integração de *HXGPRT* no locus correto, bem como a ausência da região codificadora dos genes de interesse nos parasitas knockout.

Além disso, gostaríamos de preparar uma linhagem de *N. caninum*, baseada nos parasitos NcLiv $\Delta h\Delta k$, para o estudo de genes essenciais. Assim, geramos uma linhagem de parasitos portando um sistema degron induzível por auxina (AID) para depleção proteica condicional (Figura 6A). Com este intuito, primeiro tentamos expressar a proteína Tir1 utilizando vetor descrito anteriormente para *T. gondii* (BROWN; LONG; SIBLEY, 2018), mas não conseguimos obter parasitas que expressassem a construção de forma estável (não mostrado). Assim, substituímos o promotor de Tubulina 1 de *T. gondii* do vetor original pelo promotor de NcGRA7 (Figura 6B), que rendeu expressão estável da proteína localizada no citoplasma do parasita, como esperado (Figura 6C).

Para validar o sistema AID em *N. caninum*, utilizamos a proteína nuclear NCLIV_049870, devido à predição de sua essencialidade no ortólogo de *T. gondii* (TGGT1_235420). Como controle, primeiro marcamos TGGT1_235420 com AID em linhagem de *T. gondii* que expressa Tir1 e verificamos que TGGT1_235420 AID estava localizado de forma semelhante no núcleo (Figuras 7A e 7B). A eliminação da proteína por meio da adição do ácido indolacético (Auxina, IAA) resultou em uma interrupção do crescimento dos parasitas, com a presença de taquizoítos únicos em vacúolos, alguns dos quais estavam em processo de endodiogenia (Figura 7B). Muitos vacúolos possuíam espaço adicional vazio, sem a presença de parasitos. Em adição, estes parasitos não proliferaram mediante tratamento prolongado com IAA, como demonstrado pelos ensaios de placa (Figura 7C), comprovando a predição de que TGGT1_235420 é um gene essencial em *T. gondii*.

Em seguida, marcamos por AID o gene NCLIV_049870 em *N. caninum* que expressa Tir1 (NcLiv $\Delta h\Delta k$ _Tir1; Figura 7D), confirmando a fusão da proteína com AID localizada no núcleo (Figura 7E). O tratamento dos parasitos NCLIV_049870-AID com IAA resultou em uma parada no crescimento e letalidade idêntica ao observado em *T. gondii*, com a presença de taquizoítos inchados e aumento do espaço vacuolar (Figuras 7E e 7F). Isto demonstra que o sistema AID é funcional em *N. caninum* e mostra que este fator nuclear que nos identificamos é essencial em ambos os parasitos.

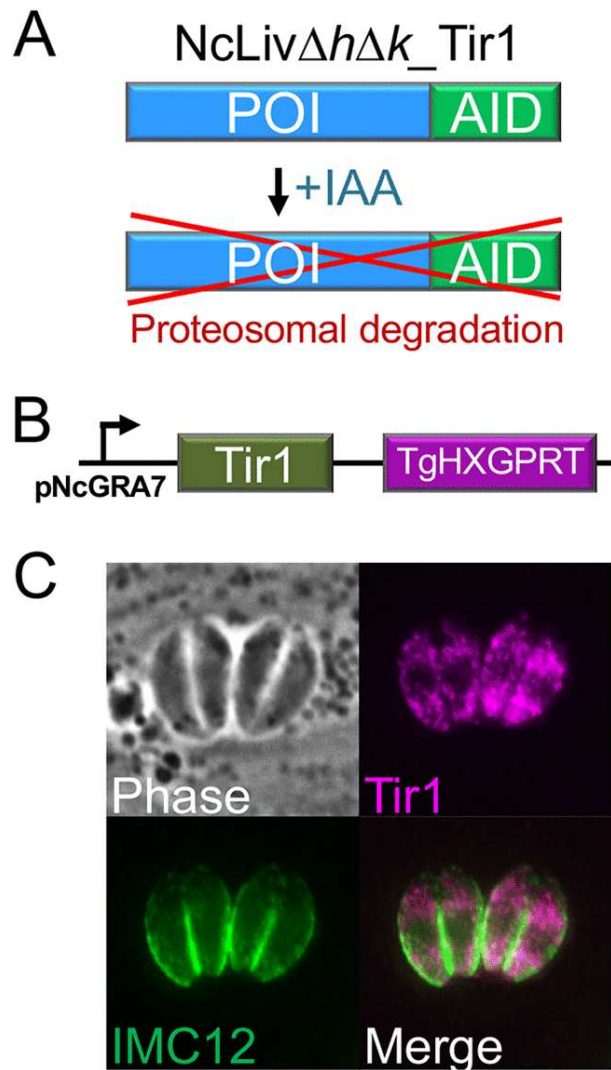


Figura 6: Expressão estável de Tir1 em NcLiv $\Delta h\Delta k$. (A) Diagrama do sistema AID mostrando que uma fusão translacional degron induzível por auxina produzida por marcação gênica endógena. A adição de ácido indolacético (IAA) resulta na degradação proteossômica da proteína de fusão. (B) Diagrama de Tir1 induzido a partir do promotor de *GRA7* de *N. caninum*, com *TgHXGPRT* como marcador de seleção. (C) IFA de parasitas NcLiv $\Delta h\Delta k$ expressando Tir1-FLAG. Como esperado, o Tir1 localiza-se no citoplasma dos parasitas. IMC12 foi utilizado para mostrar a periferia dos parasitos.

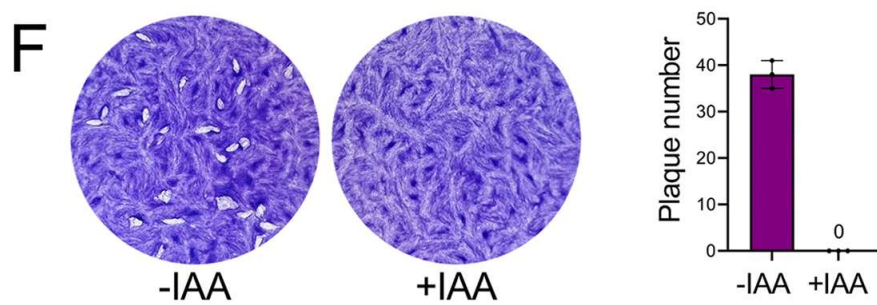
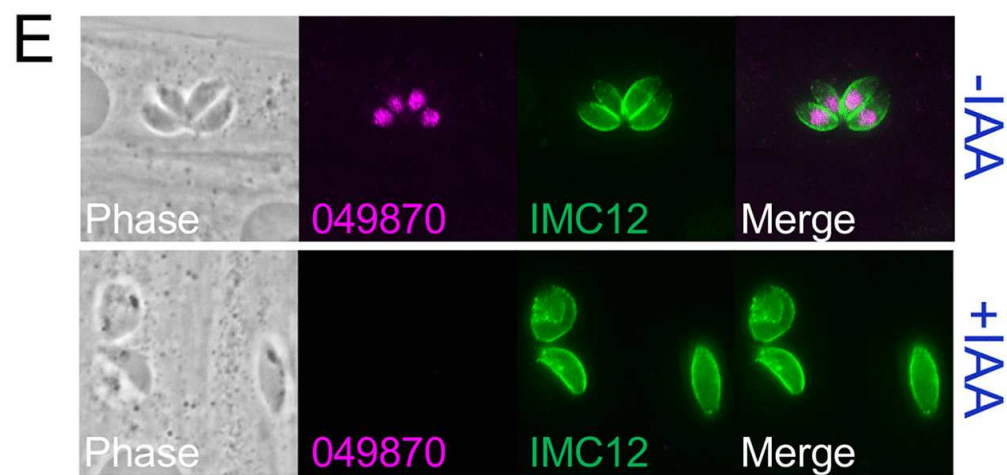
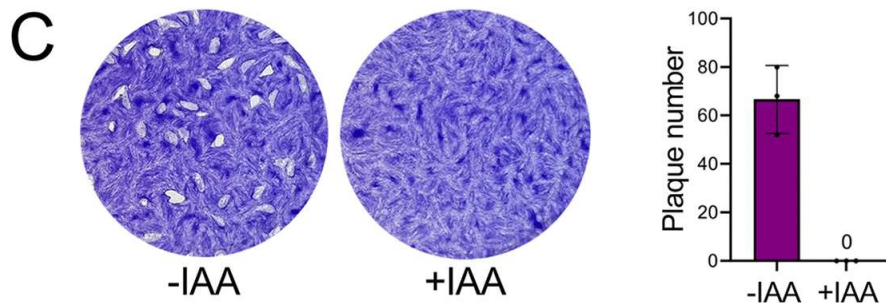
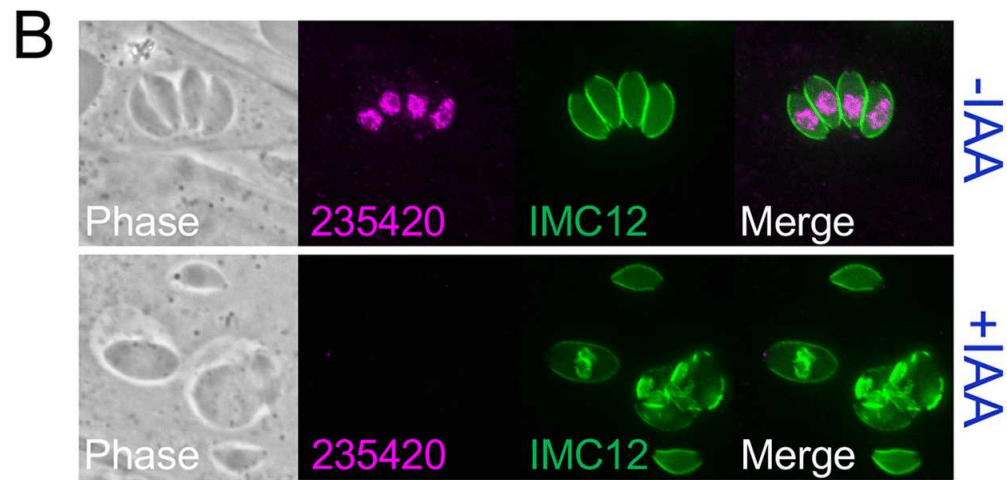


Figura 7: O knockdown condicional de uma nova proteína nuclear demonstra essencialidade em *T. gondii* e *N. caninum*. (A) Diagrama de TGGT1_235420 endógeno marcado com AID em *T. gondii* que expressa Tir1. A marcação inclui uma etiqueta de 3xHA para detecção e um cassete com DHFR para seleção. (B) IFA mostrando que a adição de IAA em 24 horas resulta na perda do sinal nuclear de HA e na interrupção do crescimento dos parasitos. Múltiplos vacúolos são mostrados mediante tratamento com IAA para destacar que os parasitas param em um único parasita por vacúolo, com alguns em processo de replicação. Vacúolos expandidos também são observados. (C) Ensaios de placa e quantificação do número de placas mostrando que nenhuma placa é formada após o knockdown de TGGT1_235420, confirmando que a proteína é essencial em *T. gondii*. (D) Diagrama de NCLIV_049870 endógeno marcado com AID em *N. caninum* que expressa Tir1. (E) IFA mostrando que a adição de IAA resulta em uma parada de crescimento semelhante dos parasitos com vacúolos inchados. (F) Ensaios de placa e quantificação do número de placas mostrando que NCLIV_049870 é essencial em *N. caninum*.

4.2. Modelo para ensaios de descoberta, localização e análise funcional de proteínas ortólogas de *T. gondii* e *N. caninum*

Agora com a possibilidade de se editar de forma eficiente o genoma de *N. caninum*, voltamos nossas atenções para descrever um modelo de descoberta de novas proteínas desse parasito, bem como comparar seu conteúdo proteico com *T. gondii* e, por fim, identificar possíveis fatores de virulência utilizados por estes protozoários para driblar as respostas imunes produzidas pelos hospedeiros.

Com o auxílio de ensaios de proteômica com enfoque na localização subcelular de proteínas de *T. gondii* (BARYLYUK *et al.*, 2020) ou da expressão de genes durante as fases aguda e crônica da infecção por *T. gondii* em camundongos (PITTMAN; ALIOTA; KNOLL, 2014), escolhemos dois genes codificadores de GRAs que possuem ortólogos em *N. caninum* e *T. gondii*: *GRA48* e *GRA62*. Utilizamos a análise destes dois genes para prosseguirmos com a validação do modelo de estudo que estamos propondo e, neste caso em específico, a análise funcional comparativa de GRAs em modelo murino.

Um dos critérios de escolha destes alvos foi a sua expressão diferencial em fases evolutivas distintas, predominantemente como taquizoítos em infecções agudas ou bradizoítos em infecções crônicas (PITTMAN; ALIOTA; KNOLL, 2014). Segundo esta base de dados, *GRA62* é expresso principalmente por taquizoítos que se replicam rapidamente durante a infecção aguda, enquanto que *GRA48* é mais expresso durante a fase crônica da infecção, quando a maioria preponderante dos parasitos se transformou em bradizoítos (Figura 8). Com interesse nesta dualidade, primeiramente localizamos estes alvos em *T. gondii* e *N. caninum* por meio da fusão de etiqueta de 3xHA na porção C terminal da proteína, por CRISPR/Cas9. Verificamos que *GRA48* encontra-se amplamente distribuída no vacúolo parasitóforo (PV) de ambos os parasitos após 24 horas de infecção de monocamadas de fibroblastos humanos (Figura 9). Quanto a *GRA62*, notamos que a proteína está localizada no vacúolo de ambos os parasitos, contudo nossos ensaios mostraram uma marcação menos intensa em *T. gondii* e um padrão de acúmulo heterogêneo nos PVs de *N. caninum* (Figura 10).

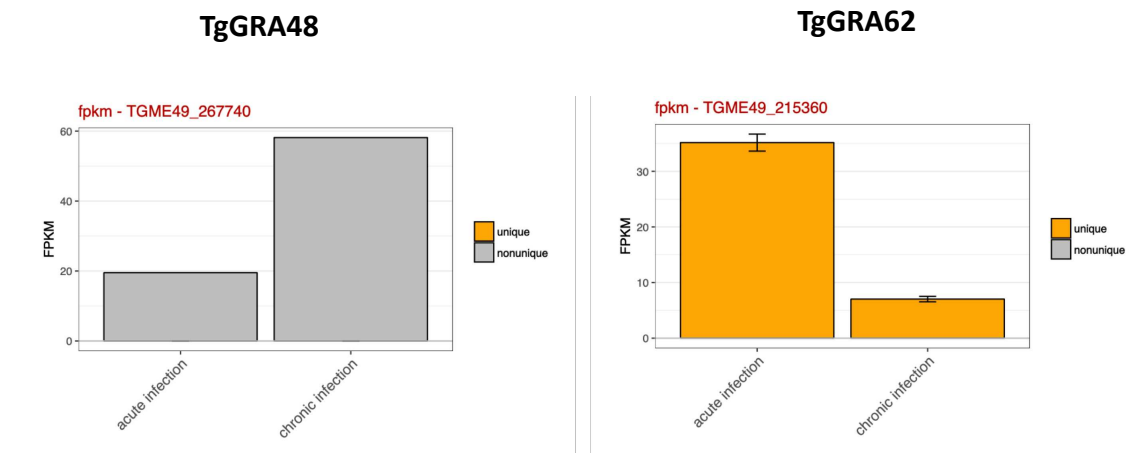


Figura 8: Expressão gênica diferencial de TgGRA48 e TgGRA62 durante as fases aguda e crônica da infecção por *T. gondii* em camundongos. Dados obtidos da base de dados ToxoDB, com base em experimentos anteriores (PITTMAN; ALIOTA; KNOLL, 2014).

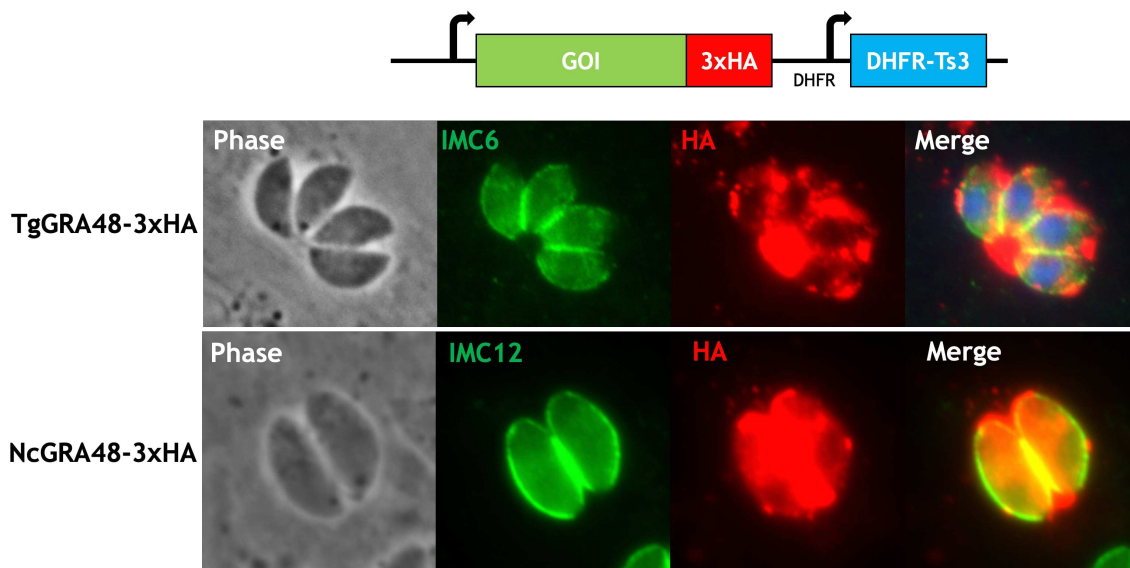


Figura 9: Localização de GRA48 em *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* por meio da fusão de etiqueta contendo epítomos de hemaglutinina (3xHA) acompanhado de cassete de resistência DHFR, para seleção de parasitos transfectados. Em ambos os casos, os constructos GRA48-3xHA são localizados nos vacúolos parasitóforos. Utilizamos anticorpo contra IMC12 para marcar a superfície do parasito.

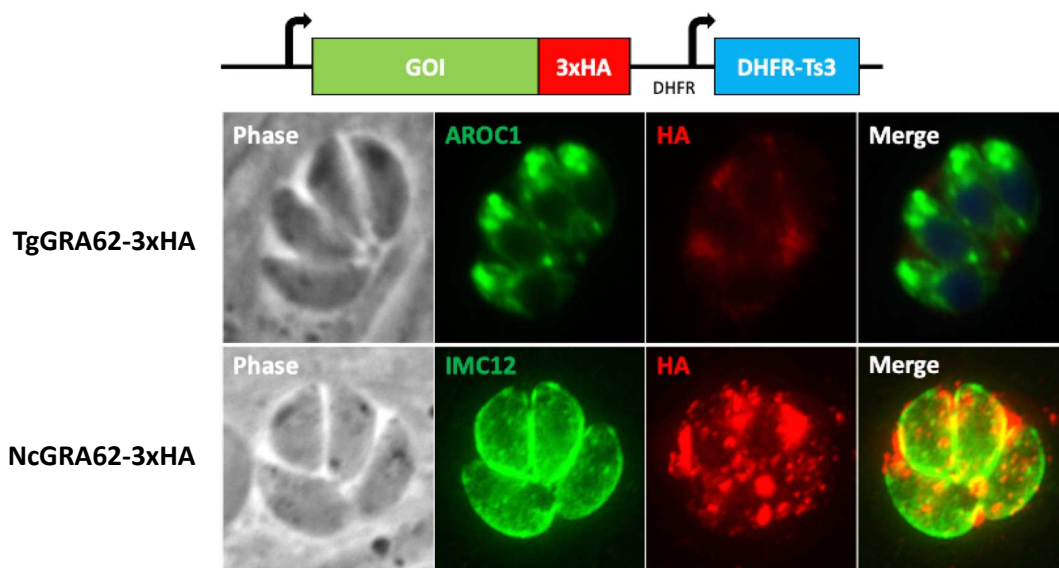


Figura 10: Localização de GRA62 em *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* por meio da fusão de etiqueta contendo epítomos de hemaglutinina (3xHA) acompanhado de cassete de resistência DHFR, para seleção de parasitos transfectados. Em ambos os casos, os constructos GRA62-3xHA são localizados nos vacúolos parasitóforos. Utilizamos anticorpo contra AROC1 e IMC12 para marcar organelas apicais e a superfície do parasito, respectivamente.

Com a intenção de testar a predição da dicotomia de expressão destas proteínas nas diferentes fases da infecção, aproveitamos uma característica genética relevante da cepa base de *T. gondii* utilizada para a marcação endógena destas proteínas: a cepa PRU utilizada foi previamente manipulada geneticamente para expressar GFP em fusão com o gene *Ldh2*, que é expresso somente quando o parasito se converte em bradizoíta (SINGH; BREWER; BOOTHROYD, 2002). Assim, realizamos um processo de interconversão de estágio dos parasitos em cultivo celular, baseado no tratamento das monocamadas de fibroblastos infectados com doadores de óxido nítrico (nitroprussiato de sódio, SNP, 70 μ M) a cada 24h (PMID: 12204225). No quinto dia de incubação, realizamos uma imunofluorescência para detectar a expressão da etiqueta de 3xHA fusionada a cada uma das proteínas em análise, bem com a expressão do GFP ligado a LDH2 (Figura 11).

Observamos que GRA48-3xHA foi expresso de forma ubiquitária, estando presente tanto em taquizoítos (parasitos LDH2-GFP negativos) como bradizoítos (parasitos LDH2-GFP positivos). Em contrapartida, a expressão de GRA62-3xHA somente foi observada em parasitos LDH2 negativos, caracterizando sua produção como sendo específica para taquizoítos. Para verificar se fenômeno semelhante se repetiria com as proteínas ortólogas de *N. caninum*, realizamos ensaio semelhante em linhagem de NcLiv $\Delta h\Delta k$ com etiqueta de 3xHA fusionada a GRA48 e GRA62. Para visualizar a interconversão em bradizoítas, utilizamos a aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA), uma lectina que se liga à N-acetilgalactosamina, o qual é abundante em glicoproteínas secretadas pelo parasito durante este estágio evolutivo (GUEVARA; FOX; BZIK, 2020). Como esperado, o resultado foi o mesmo: NcGRA62 também é expresso somente em taquizoítos (Figura 12), enquanto NcGRA48 é expresso em todos os estágios evolutivos avaliados (dados não mostrados).

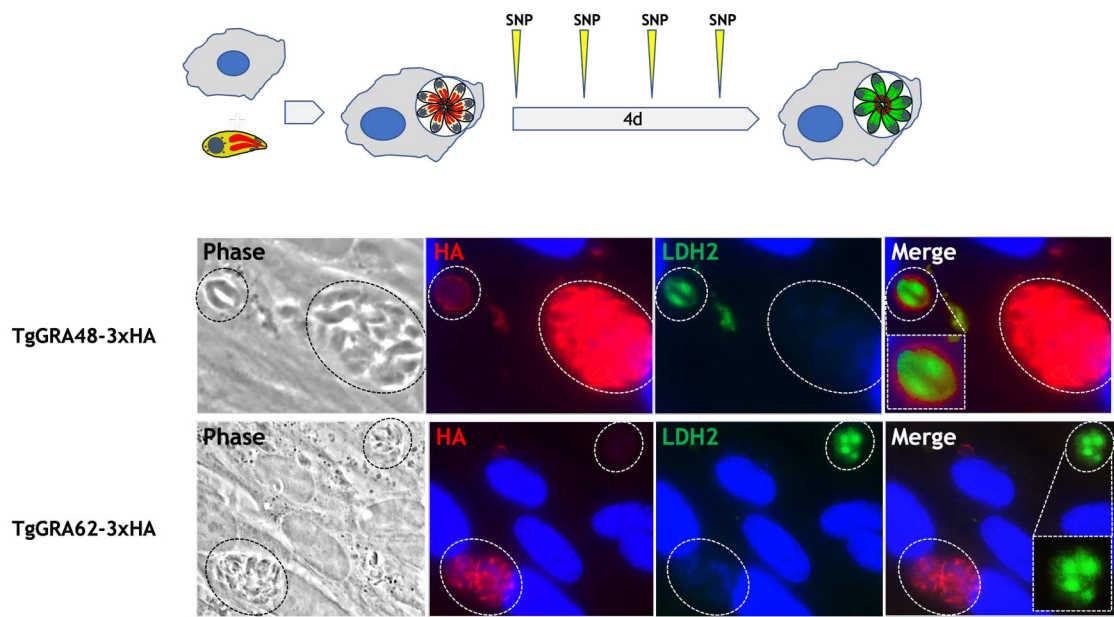


Figura 11: Expressão diferencial das proteínas secretadas GRA48 e GRA62 em diferentes estágios evolutivos de *Toxoplasma gondii*. Monocamadas contendo fibroblastos humanos (HFF) e clones de *T. gondii* contendo a fusão de epítomos de hemaglutinina (3xHA) nas proteínas GRA48 ou GRA62, bem como a fusão de GFP a lactato desidrogenase (LDH2, específica de bradizoítos), foram submetidos ao tratamento diário com nitroprussiato de sódio (SNP, 70 μ M) para induzir a interconversão de estágio (taquizoíta para bradizoíta). GRA48-3xHA é detectado em taquizoíitos (LDH2-GFP-) e bradizoítos (LDH2-GFP+), enquanto GRA62-3xHA é expresso somente em parasitos LDH2_GFP-.

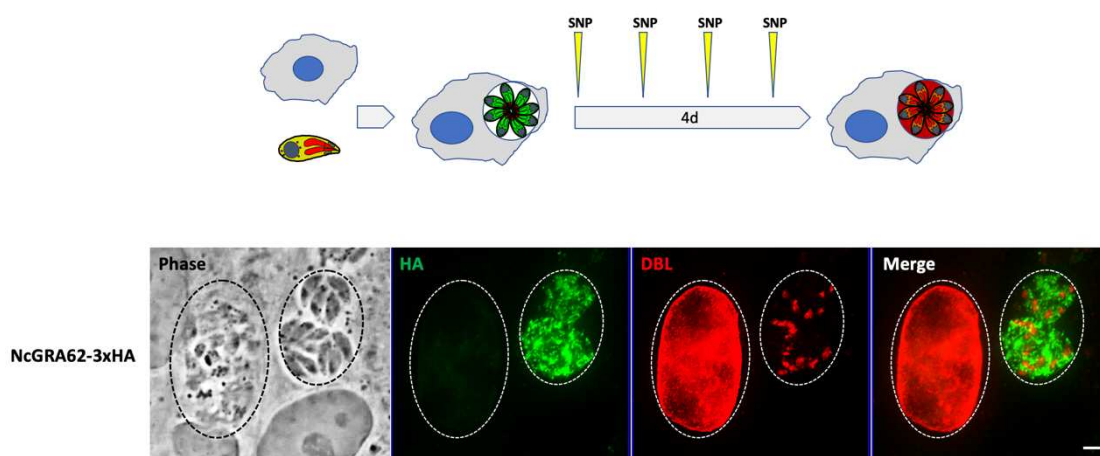


Figura 12: Expressão diferencial da proteína secretada GRA62 em diferentes estágios evolutivos de *Neospora caninum*. Monocamadas contendo fibroblastos humanos (HFF) e clone de *N. caninum* contendo a fusão de epítomos de hemaglutinina (3xHA) na proteína GRA62 foi submetido ao tratamento diário com nitroprussiato de sódio (SNP, 70 μ M) para induzir a interconversão de estágio (taquizoíta para bradizoíta). A aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA) conjugada a ficoeritrina foi utilizada para evidenciar os bradizoítos. Conforme observado em *T. gondii*, GRA62-3xHA é exposto somente em taquizoítos (DBA-).

Com base nestas informações, buscamos então compreender se estas proteínas de grânulos densos são capazes de alterar as respostas de macrófagos murinos em resposta a infecção por *T. gondii*. Primeiramente, buscamos compreender se haveria participação destas proteínas na indução de citocinas que são produzidas nos primeiros momentos da infecção. Para tal, macrófagos diferenciados da medula óssea de camundongos C57BL/6 (BMDM) foram infectados com taquizoítos geneticamente deficientes de *GRA48* ($\Delta gra48$) ou *GRA62* ($\Delta gra62$), na proporção de 1 taquizoíto para cada BMDM. Após 18 horas de incubação, dosamos a concentração das citocinas IL-12p40, IL-10 e IL-1 β no sobrenadante do cultivo celular (Figura 13). Com base neste protocolo experimental, não detectamos diferenças significativas na produção das referidas citocinas entre os parasitos parentais (WT), $\Delta gra48$ e $\Delta gra62$.

Apesar de não encontrarmos diferenças na concentração de IL-1 β nos sobrenadantes de BMDMs infectados com os parasitos parentais ou geneticamente deficientes nas GRAs em análise, buscamos compreender se a ausência destes genes afetaria a ativação do complexo do inflamassoma, por meio da sonda fluorescente FAM-YVAD-FMK (Flica), que se liga a caspase-1 e caspase-11 ativas e oligomerizadas. Com este propósito, realizamos um procedimento experimental semelhante ao anterior: infectamos BMDMs na proporção de 1 parasito por célula e incubamos por 18 horas. Após este período, incubamos as células com Flica e realizamos a leitura em leitor de microplacas e por microscopia (Figura 14). Conforme esperado, não observamos diferenças de ativação do inflamassoma entre BMDMs infectados com a linhagem parental de *T. gondii* utilizada, ou com as linhagens $\Delta gra48$ e $\Delta gra62$.

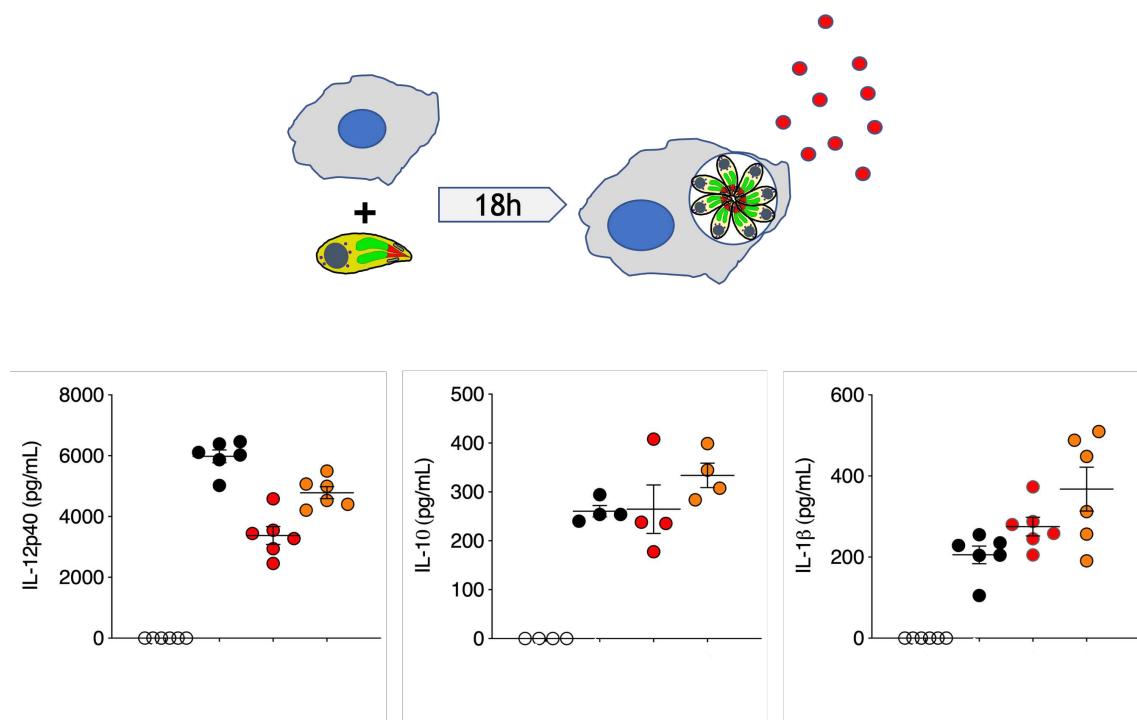


Figura 13: Avaliação da produção de (A) IL-12p40, (B) IL-10 e (C) IL-1 β em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6, infectados com taquizoítos selvagens da cepa PRU de *T. gondii* (proporção 1:1 parasito/célula), ou geneticamente deficientes em *GRA48* ou *GRA62*.

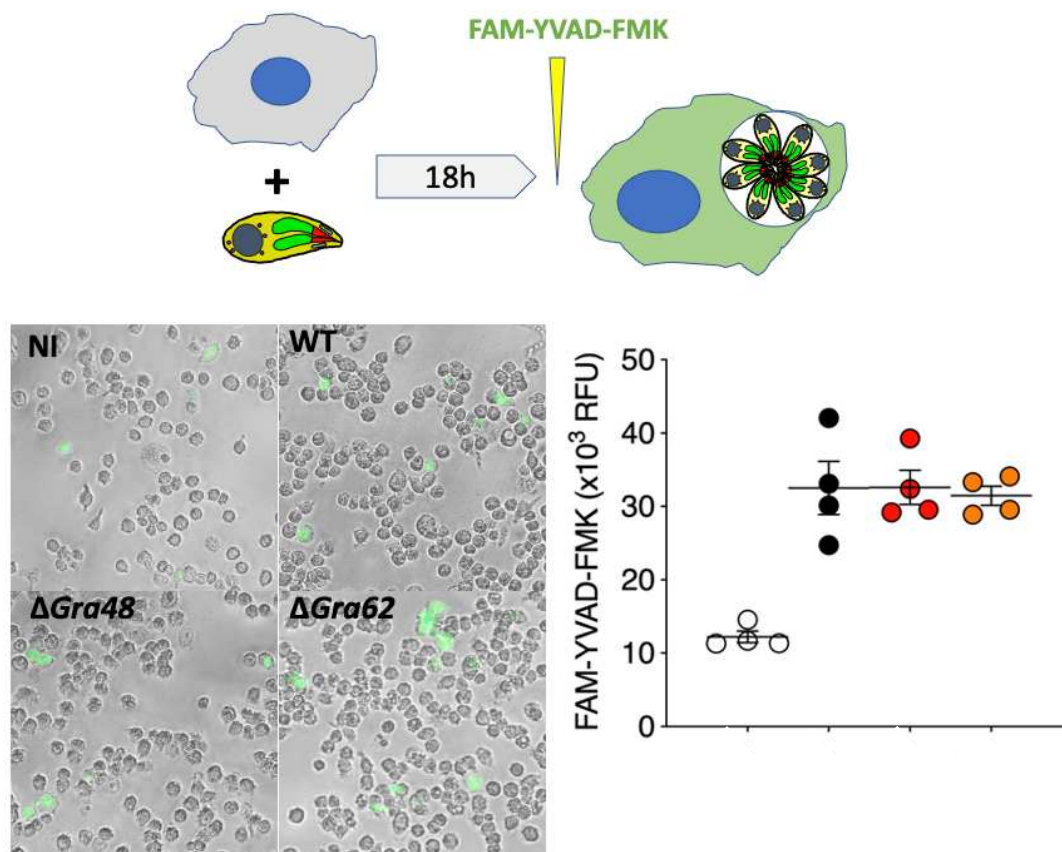


Figura 14: Avaliação da ativação do complexo do Inflamassoma por meio da sonda fluorescente FAM-YVAD-FMK em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6, infectados com taquizoítos selvagens da cepa PRU de *T. gondii* (proporção 1:1 parasito/célula), ou geneticamente deficientes em *GRA48* ou *GRA62*. Os resultados foram visualizados por meio de microscopia ou a incorporação da sonda quantificada em leitor de microplacas.

Buscamos também compreender se estes genes codificadores de proteínas de grânulos densos estariam envolvidos na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo estas importantes moléculas efetoras utilizadas pelas células imunes para conter a expansão parasitária, como também um forte indicativo do estresse celular gerado pela infecção. Seguimos o mesmo desenho experimental aplicado aos ensaios anteriores, adicionando ao final do período de incubação a sonda fluorescente DHFC-DA, que reage com subprodutos da oxidação celular emitindo fluorescência, possibilitando a quantificação do estresse oxidativo (Figura 15). Por meio desta abordagem experimental, observamos que os BMDMs infectados com parasitos geneticamente deficientes em *GRA62* produziram quantidades significativamente maiores de ROS durante o período observado, indicando que a proteína codificada por este gene tem um papel de inibir a oxidação durante o processo infeccioso.

Por fim, para se determinar se estes genes codificadores de GRAs são relevantes durante a infecção *in vivo*, mensuramos se a ausência destas proteínas afetaria o processo de colonização crônica do sistema nervoso central do hospedeiro pelo *T. gondii*. Para tal finalidade, realizamos a infecção de camundongos C57BL/6 com uma dose subletal de taquizoítos da cepa parental (300 parasitos/animal, ip), bem como das linhagens $\Delta gra48$ e $\Delta gra62$ geradas, para comparar a carga parasitária após 30 dias de infecção. Para obter tais resultados, contamos a quantidade de cistos teciduais fluorescentes (LDH2-GFP+) em amostras de cérebro fresco e estimamos a carga infecciosa final por extrapolação. Por meio deste protocolo, observamos que o grupo de camundongos infectados com parasitos $\Delta gra62$ apresentou uma diminuição no número de cistos cerebrais após o período em análise, quando comparado com animais infectados com os parasitos WT e $\Delta gra48$ (Figura 16), sugerindo que esta proteína está envolvida no aumento da carga parasitária cerebral durante a infecção.

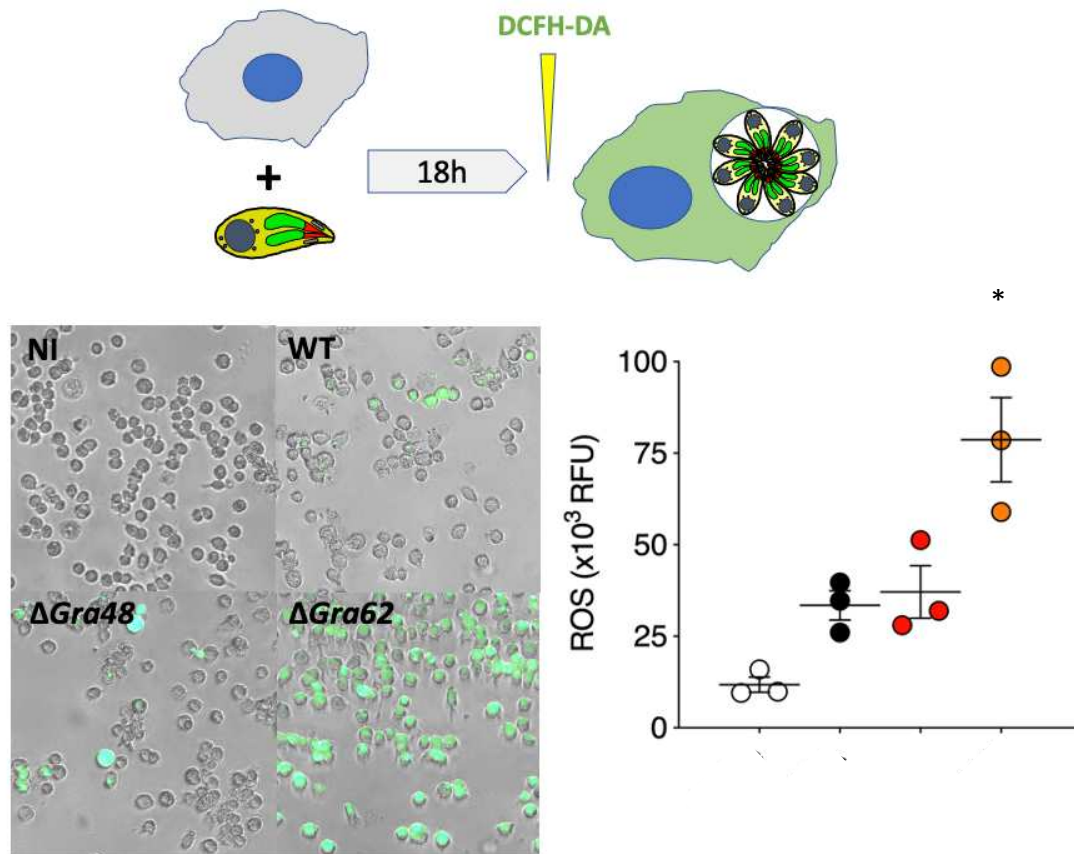


Figura 15: Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por meio da sonda fluorescente DCFH-DA em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6, infectados com taquizoítos selvagens da cepa PRU de *T. gondii* (proporção 1:1 parasito/célula), ou geneticamente deficientes em *GRA48* ou *GRA62*. Os resultados foram visualizados por meio de microscopia ou a incorporação da sonda quantificada em leitor de microplacas. * $p \leq 0,05$

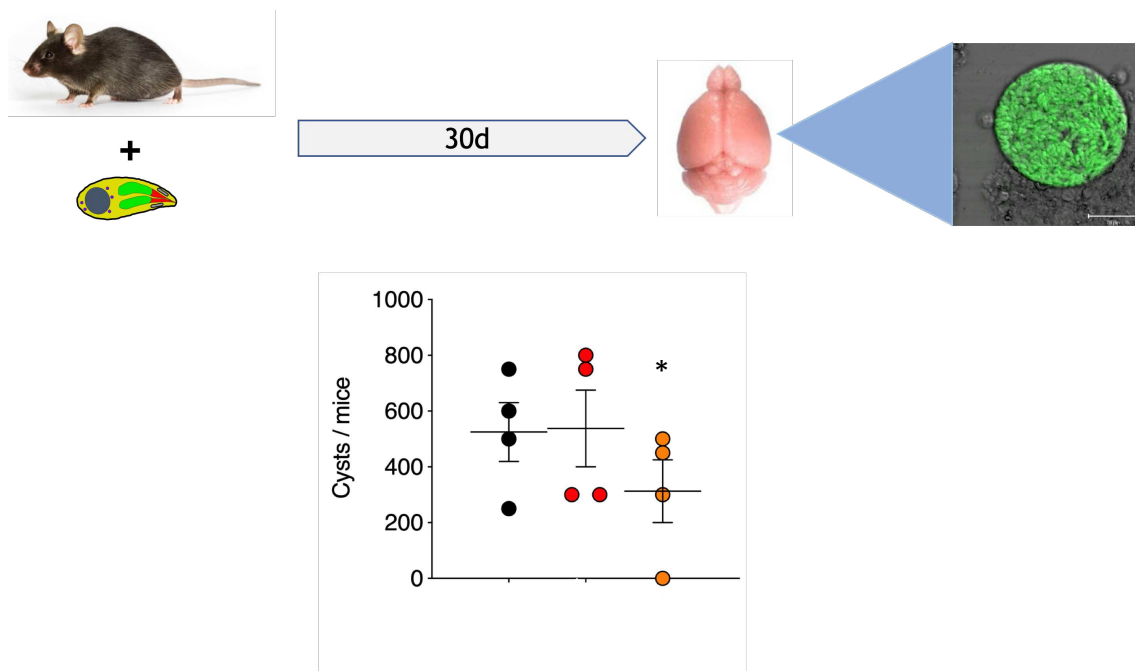


Figura 16: Contagem de cistos teciduais presentes no sistema nervoso central de camundongos C57BL/6 infectados por 30 dias com parasitos selvagens da cepa PRU de *T. gondii* (300 taquizoítos/camundongo, via i.p.), ou geneticamente deficientes em *GRA48* ou *GRA62*. Os resultados foram obtidos por meio de contagem de ao menos 3 lâminas contendo amostras de cada animal, por meio de microscopia. * $p \leq 0,05$

Com a intenção de identificar o conjunto das GRAs produzidas pelo *N. caninum*, buscamos então implementar estratégias de descoberta de múltiplos alvos por meio de ensaios de proteômica. As GRAs são proteínas secretadas no vacúolo parasitóforo (PV) e tem como funções conhecidas a estruturação do próprio PV, bem como a formação de poros para passagem de micronutrientes ou de fatores de virulência que atuarão nas organelas da célula hospedeira (CYGAN *et al.*, 2019; FRANCO *et al.*, 2016; GOLD *et al.*, 2015).

Com este intuito, utilizamos uma abordagem proteômica baseada na biotinylation por proximidade para a identificação das GRAs presentes nos PVs. Utilizamos duas proteínas ‘iscas’ distintas para obter estes resultados:

1) TgGRA24 - uma GRA de *T. gondii* superexpressa em NcLiv Δh que não possui ortólogo em *N. caninum* e sabidamente tem a capacidade de interagir com proteínas citoplasmáticas do hospedeiro (Mota *et al.*, 2016, Figura 17);

2) NcGRA48 – GRA endógena de *N. caninum* com expressão predita como moderada durante a infecção de células de mamíferos em outros ensaios de proteômica e transcriptômica dispostos em bases de dados pública (ToxoDB.org) (Figura 18).

Estas proteínas foram fusionadas em sua porção C-terminal com um constructo contendo uma biotina ligase de *E. coli* (BirA), que confere a capacidade das ‘iscas’ escolhidas de biotinilar todos os alvos proteicos em um raio de até 10 nm de distância, que foram posteriormente identificadas por espectrometria de massas.

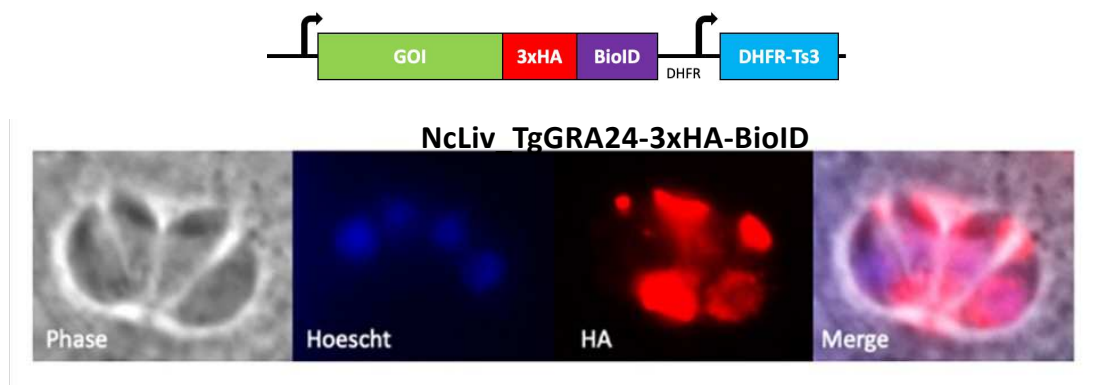


Figura 17: Imunofluorescência determinando a inserção randômica no genoma de *Neospora caninum* do gene codificador da proteína GRA24 de *Toxoplasma gondii* fusionada com etiqueta contendo epítomos de hemaglutinina e BirA na porção C-terminal. Figura previamente publicada em (MOTA *et al.*, 2016).

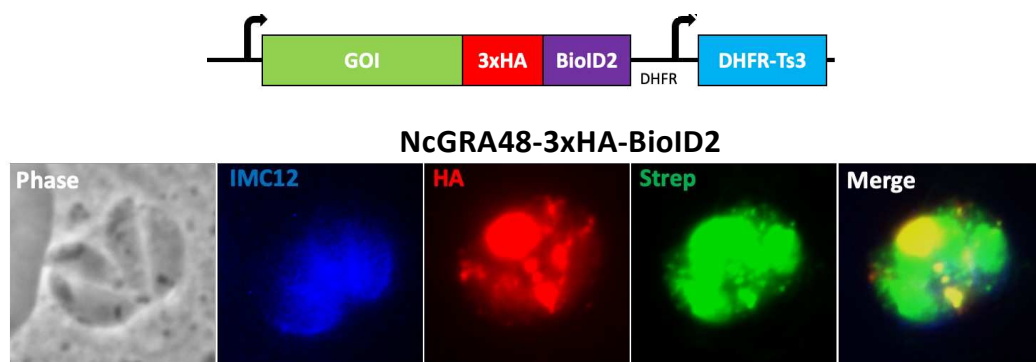


Figura 18: Imunofluorescência determinando a correta fusão de etiqueta contendo epítomos de hemaglutinina e BirA na porção C-terminal da proteína GRA48 endógena de *N. caninum*.

Por meio destas estratégias, conseguimos identificar 53 proteínas de *N. caninum* com sequências ortólogas a GRAs de *T. gondii*. Este número corresponde a 63% das 102 proteínas atualmente caracterizadas como sendo advindas desta organela em *T. gondii*, considerando que ao menos 18 destas proteínas não possuem genes codificantes ortólogos em *N. caninum* (Tabela 2).

Os resultados obtidos com a inserção de TgGRA24 foram mais robustos em geral, identificando 52 proteínas preditas como GRAs de *N. caninum*, durante a infecção em fibroblastos humanos. Em adição, sequenciamos em média 10 peptídeos de cada GRA identificada nos experimentos que utilizaram a inserção de TgGRA24_BriA em taquizoítos de *N. caninum*.

Já os experimentos utilizando a NcGRA48 endógena fusionada à etiqueta com BirA resultou na identificação de 31 GRAs, com média de 6 peptídeos reconhecidos para cada proteína, excluindo-se a própria GRA48, que foi o alvo mais abundantemente sequenciado.

Apesar das diferenças aqui apontadas quanto aos resultados obtidos com as duas 'iscas' utilizadas, é preciso ressaltar que os resultados foram coerentes entre si. Das 31 proteínas identificadas no experimento com NcLiv Δh _GRA48-BirA, apenas uma (CPC2) não foi também encontrada nas amostras que utilizaram a superexpressão de TgGRA24 como 'isca'.

Tabela 2: Lista de proteínas de Grânulos Densos já caracterizadas em *Toxoplasma gondii* (n = 102), com a identificação do gene ortólogo em *Neospora caninum*, e o número de peptídeos correspondentes identificados nos ensaios de biotinizacão por proximidade utilizando a superexpressão de TgGRA24 portando BirA ou pela fusão da etiqueta de BirA na sequência endógena da proteína NcGRA48.

Nome	Gene ID T. gondii	Gene ID N. caninum	TgGRA24_BirA*	NcGRA48_BirA*
BPK1	TGME49_253330	NCLIV_007770	7	6
CST4	TGME49_261650	NCLIV_025840	0	0
Cyclophilin	TGME49_221210	NCLIV_004790	10	0
GRA01	TGME49_270250	NCLIV_036400	17	4
GRA02	TGME49_227620	NCLIV_045650	46	15
GRA03	TGME49_227280	NCLIV_045870	6	1
GRA04	TGME49_310780	NCLIV_054830	0	0
GRA05	TGME49_286450	NCLIV_014150	3	0
GRA06	TGME49_275440	NCLIV_052880	9	0
GRA07	TGME49_203310	NCLIV_021640	11	5
GRA08	TGME49_254720	NCLIV_008990	7	2
GRA09	TGME49_251540	NCLIV_066630	10	14
GRA10	TGME49_268900	NCLIV_037450	0	0
GRA11A	TGME49_212410	#N/D	#N/D	#N/D
GRA11B	TGME49_237800	#N/D	#N/D	#N/D
GRA12	TGME49_288650	NCLIV_041120	8	10
GRA12A	TGME49_220890	NCLIV_004670	0	0
GRA12B	TGME49_275860	NCLIV_007080	0	0
GRA12C	TGME49_275850	#N/D	#N/D	#N/D
GRA12D	TGME49_308970	NCLIV_053420	0	0
GRA13	TGME49_237880	#N/D	#N/D	#N/D
GRA14	TGME49_239740	NCLIV_016360	4	1
GRA15	TGME49_275470	#N/D	#N/D	#N/D
GRA16	TGME49_208830	NCLIV_003340	8	2
GRA17	TGME49_222170	NCLIV_005560	1	0
GRA18	TGME49_288840	NCLIV_041250	1	1
GRA19	TGME49_311390	NCLIV_055290	0	0
GRA20	TGME49_200010	NCLIV_062670	0	0
GRA21	TGME49_241240	NCLIV_017220	0	0
GRA21	TGME49_241300	NCLIV_017230	0	0
GRA22	TGME49_215220	NCLIV_052190	8	4
GRA23	TGME49_297880	NCLIV_006780	8	6
GRA24	TGME49_230180	#N/D	103*	#N/D
GRA25	TGME49_290700	NCLIV_042680	4	0
GRA28	TGME49_231960	#N/D	#N/D	#N/D
GRA29	TGME49_269690	NCLIV_036830	16	0
GRA29	TGME49_289540	NCLIV_041790	14	0

GRA30	TGME49_232000	NCLIV_032000	3	1
GRA31	TGME49_220240	NCLIV_012370	0	0
GRA32	TGME49_212300	NCLIV_049090	0	0
GRA33	TGME49_247440	#N/D	#N/D	#N/D
GRA34	TGME49_203290	NCLIV_021660	1	0
GRA35	TGME49_226380	NCLIV_046580	6	1
GRA36	TGME49_213067	NCLIV_013180	11	1
GRA37	TGME49_236890	NCLIV_050790	1	0
GRA38	TGME49_312420	NCLIV_055980	14	2
GRA39	TGME49_289380	NCLIV_041740	19	1
GRA40	TGME49_219810	NCLIV_060810	10	0
GRA41	TGME49_069070	NCLIV_037300	0	0
GRA42	TGME49_236870	NCLIV_050780	0	0
GRA43	TGME49_237015	#N/D	#N/D	#N/D
GRA44	TGME49_228170	NCLIV_045260	8	4
GRA45	TGME49_316250	NCLIV_058760	1	0
GRA46	TGME49_208370	NCLIV_003050	20	0
GRA47	TGME49_254000	NCLIV_008310	0	0
GRA48	TGME49_267740	NCLIV_069360	15	54
GRA49	TGME49_244530	NCLIV_019080	0	0
GRA50 (CST2)	TGME49_203600	NCLIV_021410	3	1
GRA51 (CST3)	TGME49_230705	#N/D	#N/D	#N/D
GRA52 (CST5)	TGME49_319340	NCLIV_010740	17	4
GRA53 (CST6)	TGME49_260520	NCLIV_026520	7	4
GRA54 (CST8)	TGME49_204340	#N/D	#N/D	#N/D
GRA55	TGME49_309760	NCLIV_053890	6	6
GRA56	TGME49_309930	NCLIV_054050	0	0
GRA57	TGME49_217680	NCLIV_062460	28	6
GRA58	TGME49_268790	NCLIV_037560	0	0
GRA59	TgME49_313440	NCLIV_056730	1	0
GRA60	TGME49_204270	NCLIV_020960	0	0
GRA61	TGME49_269950	NCLIV_036640	4	0
MAF1	TGME49_220950	NCLIV_004730	24	5
MAF1 related protein	TGME49_279100	#N/D	#N/D	#N/D
MAG1	TGME49_270240	NCLIV_036410	37	18
MAG2	TGME49_209755	NCLIV_004020	0	0
MCP3	TGME49_208740	NCLIV_003260	0	0
MCP4	TGME49_208730	NCLIV_003250	0	0
MYR1	TGME49_254470	NCLIV_008760	0	0
MYR2	TGME49_270700	NCLIV_036070	0	0
MYR3	TGME49_237230	#N/D	#N/D	#N/D
MYR4	TGME49_211460	NCLIV_011500	20	0
NTPase I	TGME49_277240	NCLIV_068460	14	13
NTPase II	TGME49_277270	NCLIV_068460	14	13
PLP1	TGME49_232600	NCLIV_032560	12	0
ROP32	TGME49_308093	NCLIV_060730	13	19
ROP32		NCLIV_060740	0	0

ROP32		NCLIV_060741	3	0
ROP33	TGME49_201130	NCLIV_023260	0	0
ROP34/WNG2	TGME49_240090	NCLIV_000650	1	0
ROP35/WNG1	TGME49_304740	NCLIV_044410	4	3
ROP39	TGME49_262050	#N/D	#N/D	#N/D
ROP48	TGME49_234950	#N/D	#N/D	#N/D
SRS13	TGME49_222370	NCLIV_005760	0	0
SRS44/CST1	TGME49_264660	NCLIV_040495	0	0
TEEGR (HCE)	TGME49_239010	#N/D	#N/D	#N/D
TgCPC1	TGME49_289620	NCLIV_041870	0	0
TgCPC2	TGME49_276130	NCLIV_007010	0	27
TgIST	TGME49_240060	#N/D	#N/D	#N/D
TgNSM	TGME49_235140	#N/D	#N/D	#N/D
TgPI-1	TGME49_208450	NCLIV_003120	8	0
TgPI-1	TGME49_246130	NCLIV_062190	0	0
TgPI-2	TGME49_208430	NCLIV_003100	1	0
(sem nome)	TGME49_263560	NCLIV_024380	7	0
(sem nome)	TGME49_200360	NCLIV_038210	0	0

Negrito: GRA de *N. caninum* encontrada nos experimentos de BioID

Vermelho: GRA descrita em *T. gondii*, sem gene ortólogo em *N. caninum*.

Escala de cores: indica o número de peptídeos sequenciados para cada GRA encontrada. Nas extremidades da escala: Branco = 0; Amarelo/Laranja = intermediários; Vermelho = número máximo de peptídeos encontrados.

4.3. Proteínas ortólogas às caspases estão envolvidas na resistência de *T. gondii* contra mecanismos de resistência do hospedeiro

Análise filogenética de proteínas de *T. gondii* contendo domínios conservados de proteases p20 (ICE, Caspase) mostram proximidade evolutiva com metacaspases encontradas em *Saccharomyces cerevisiae* e *Trypanosoma brucei*. Em relação as caspases encontradas em humanos, as ICEs de *T. gondii* são mais próximas das Caspases 1, 4 e 12, que são conhecidas por sua participação em processos inflamatórios mediados por complexos proteicos denominados inflamassomas (Figura 19).

Fusionamos uma etiqueta endógena de 3xHA nos 3 genes codificadores de proteínas de *T. gondii* contendo os domínios ICE. Apesar da expressão da proteína ICE1 (TG GT1_206490) ser abundante e facilmente detectado por IFA e WB, as proteínas ICE2 (TG GT1_278575) e ICE3 (TG GT1_243298) possuem expressão proteica muito menor e tivemos dificuldade em detectá-las nos ensaios. Com a intenção de visualizar de forma apropriada o padrão de expressão e a localização das proteínas, fusionamos em ICE2 e ICE3 um constructo do tipo “spaghetti monster”, contendo múltiplos epítomos de hemaglutinina (SM/HA), incrementando de forma significativa a detecção das proteínas de interesse (VISWANATHAN *et al.*, 2015). Com estas estratégias, notamos que ICE1 e ICE2 possuem uma distribuição homogênea por todo o citoplasma do parasito, enquanto ICE3 localiza-se principalmente em forma de ‘puncta’ na porção anterior ao núcleo dos taquizoítos (Figura 20). É preciso, contudo, apontar que a marcação do gene *ICE2* se mostrou ‘irregular’ ou em ‘mosaico’. Mesmo com a expansão mediante clonagem de um único taquizoíto, nem todos os parasitos expressavam a proteína de forma detectável.

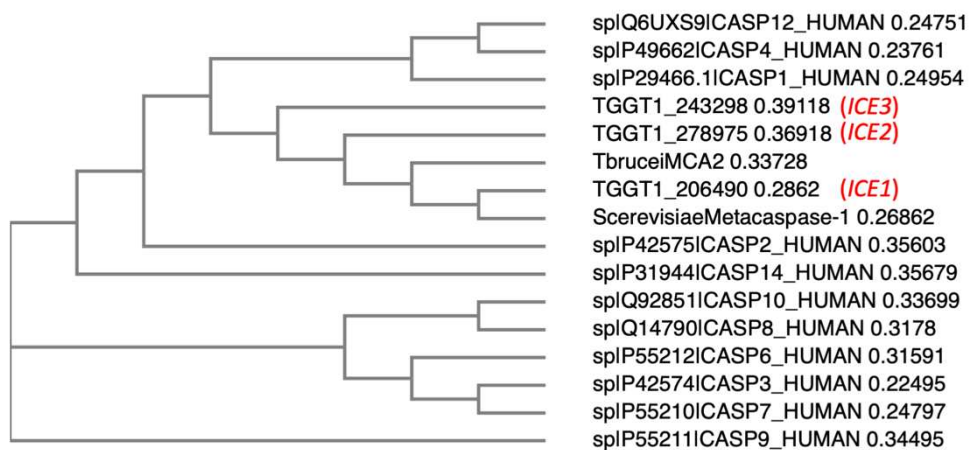


Figura 19: Análise filogenética de proteínas de *T. gondii* contendo domínios conservados de proteases p20 (ICE, Caspase) com sequências de outras caspases encontradas em seres humanos e metacaspases descritas em *Sacaromyces cerevisiae* e *Trypanossoma brucei*.

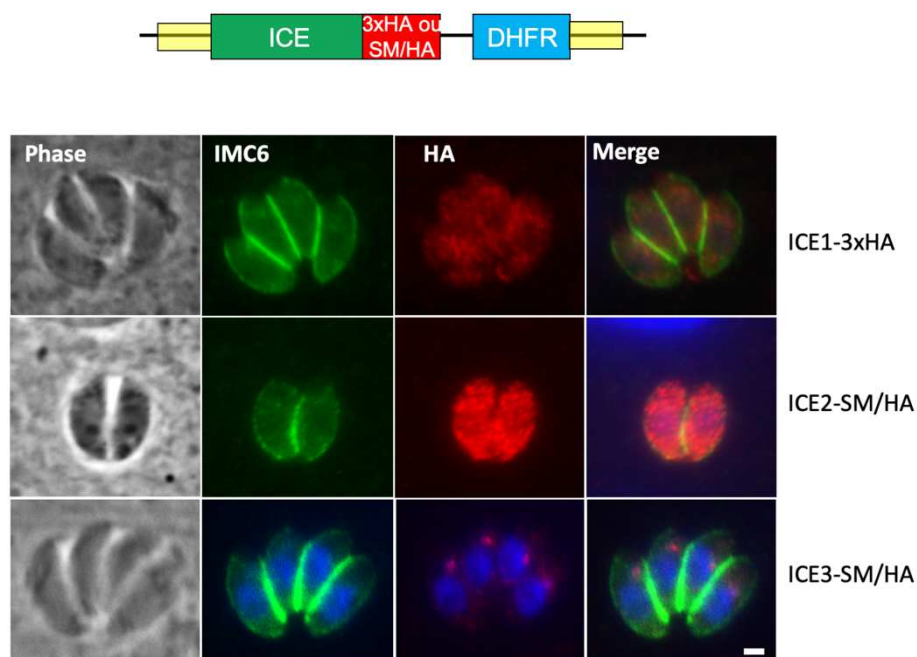


Figura 20: Localização subcelular de proteínas de *T. gondii* contendo domínios conservados de proteases p20 (ICE, Caspase). Por meio da fusão de epítomos de hemaglutinina (3xHA ou SM/HA, vermelho) na região C-terminal das ICEs, foram realizados ensaios de imunofluorescência para se determinar a localização das mesmas por microscopia. A superfície dos parasitos foi evidenciada por anticorpos policlonais contra IMC6 (verde).

Realizamos a depleção dos 3 genes codificadores de ICEs em *T. gondii*. De forma geral, não notamos diferenças na capacidade dos parasitos em se replicarem nas células hospedeiras por meio de ensaios de placa (Figura 21), não confirmando informações preditas anteriormente, que indicavam que os genes teriam característica essencial ao desenvolvimento parasitário (SIDIK *et al.*, 2016).

Para entender se as proteínas de *T. gondii* com domínios ICE possuíam interconexões funcionais, decidimos observar o comportamento das proteínas em parasitos geneticamente deficientes de um dos alvos gênicos analisados, como por exemplo: Fusionamos, por meio de edição genômica mediada pela técnica de CRISPR/Cas9, etiquetas com epítomos de HA à ICE1 em taquizoítos selvagens (WT) ou geneticamente deficientes de *ICE2* ($\Delta ice2$) ou *ICE3* ($\Delta ice3$) (Figura 22A), mensurando o padrão de expressão da proteína portadora da etiqueta por meio de western blotting e imunofluorescência. Com este racional, observamos que a ausência dos genes *ICE2* e *ICE3* não comprometeu de forma perceptível a expressão da proteína ICE1 em taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*, presentes em vacúolos parasitóforos jovens (Figura 22D), bem como em vacúolos com maior número de gerações de parasitos (Figura 22C). Observamos, contudo, um aumento da intensidade de bandas resultantes de possível degradação da proteína de 80 KDa (+3KDa da etiqueta) em parasitos $\Delta ice2$ (Figura 22B).

Em relação a expressão proteica de ICE2, conforme relatado anteriormente, esta é aparentemente inconstante e difícil de mensurar. Por western blotting, não conseguimos detectar a proteína em seu peso predito (145 KDa + 3 KDa da etiqueta), mas observamos a presença aumentada de prováveis subprodutos C-terminais de clivagem da proteína com peso molecular aproximado em 30KDa em parasitos $\Delta ice1$ e $\Delta ice3$, quando comparado aos extratos de parasitos WT (Figura 23B). Quando observamos o padrão de positividade de parasitos em vacúolos maduros, observamos o padrão de positividade parcial em taquizoítos WT: somente alguns parasitos são positivos para os epítomos de hemaglutinina fusionados à região C-terminal da proteína ICE2. Contudo, de forma

surpreendente, o número de parasitos expressando o constructo ICE2_SM/HA em parasitos $\Delta ice1$ e $\Delta ice3$ foi substancialmente reduzido (Figura 23C), quando comparado aos parasitos selvagens, apesar do padrão de marcação dentro dos diferentes parasitos ter se mantido constante, com marcação citoplasmática de razoável intensidade (Figura 23D).

Repetindo a mesma estratégia com o objetivo de observar se o perfil de expressão proteica de ICE3 é afetado pela ausência dos genes $\Delta ice1$ e $\Delta ice2$, observamos novamente que a proteína com tamanho predito de 220 KDa é naturalmente degradada em parasitos selvagens e que há algumas diferenças neste perfil de degradação na ausência dos genes *ICE1* e *ICE2*. Enquanto que em parasitos $\Delta ice1$ houve uma redução de expressão de uma banda proeminente de aproximadamente 110 KDa, notou-se a ausência de uma banda de 50 KDa em parasitos geneticamente deficientes no gene *ICE2* (Figura 24B). Quando observamos o padrão de marcação desta proteína nos taquizoítos, há uma notável queda de expressão de sua expressão na ausência de *ICE1* e *ICE2*, observada tanto em vacúolos maduros (Figura 24C) como aqueles precoces (Figura 24D), sendo a proteína muito pouco detectada em forma de puncta na parte superior do núcleo dos taquizoítos.

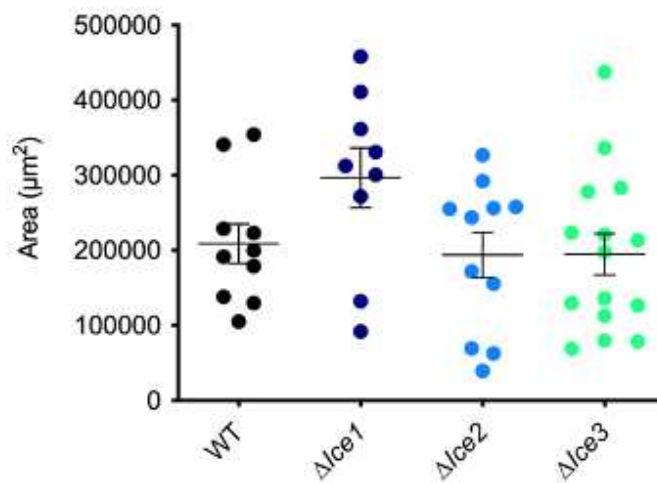


Figura 21: Mensuração da área média das placas de lise induzidas pela infecção de monocamadas de fibroblastos humanos (HFF) com taquizoitos selvagens ou geneticamente deficientes em 3 alvos de *T. gondii* que contem domínios conservados de proteases p20 (ICE).

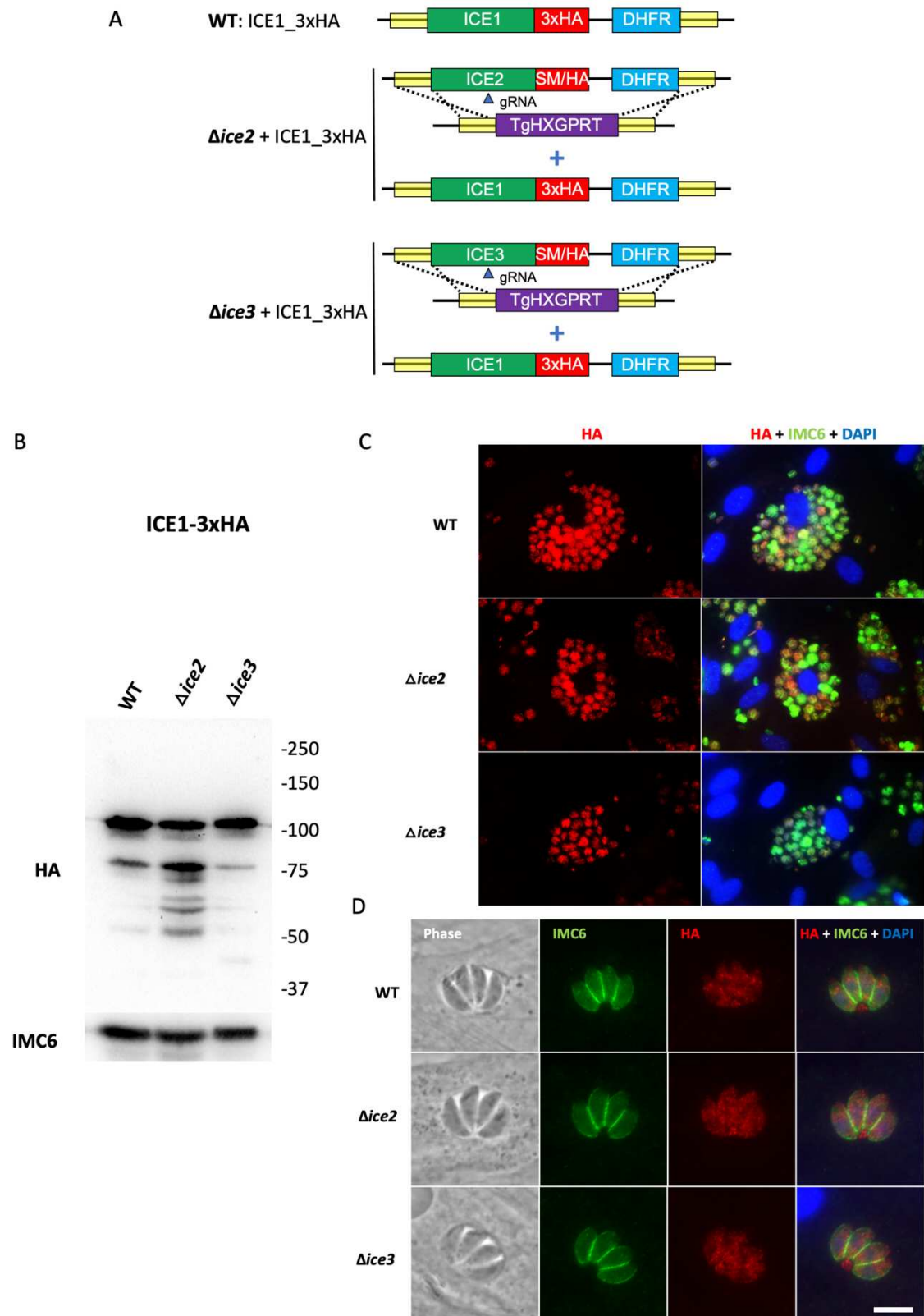


Figura 22: Avaliação do papel das proteínas de *T. gondii* que contêm domínios conservados de proteases p20 (ICE), para a expressão e correta localização de ICE1. A) Diagrama com a estratégia de depleções e fusão de etiqueta endógena à região C-terminal de ICE1 (ICE1-3xHA), em parasitos selvagens (WT) ou geneticamente deficientes de *ICE2* ($\Delta ice2$) ou *ICE3* ($\Delta ice3$). B) Western blotting para a detecção de ICE1-3xHA de lisados de parasitos WT, $\Delta ice2$ e $\Delta ice3$. Ensaio de imunofluorescência (IFA) para a detecção de ICE1-3xHA (vermelho) em vacúolos parasitóros (C) maduros ou (D) iniciais. A superfície dos parasitos foi evidenciada por anticorpos policlonais contra IMC6 (verde).

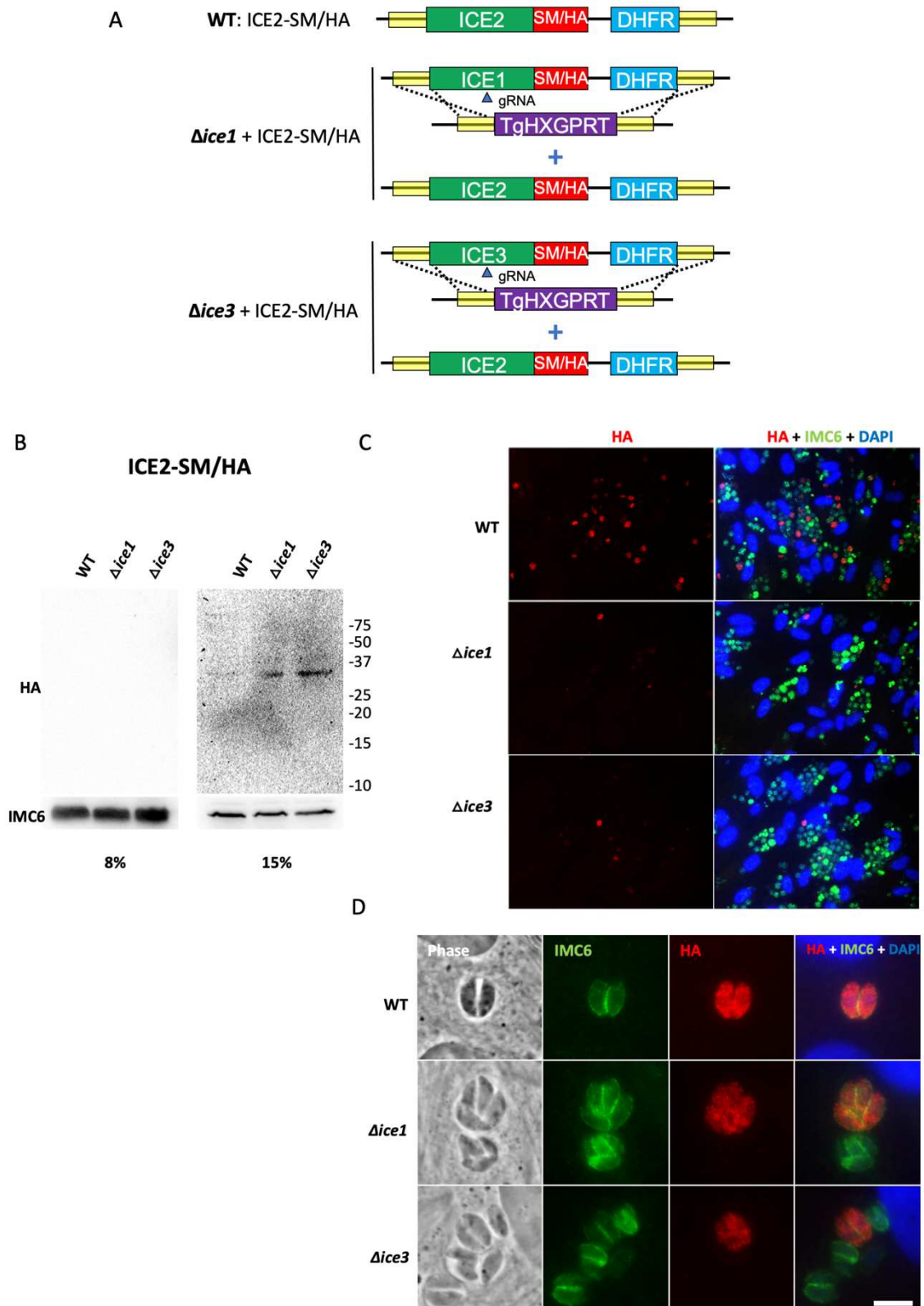


Figura 23: Avaliação do papel das proteínas de *T. gondii* que contêm domínios conservados de proteases p20 (ICE), para a expressão e correta localização de ICE2. A) Diagrama com a estratégia de depleções e fusão de etiqueta endógena à região C-terminal de ICE2 (ICE2-SM/HA), em parasitos selvagens (WT) ou geneticamente deficientes de *ICE1* ($\Delta ice1$) ou *ICE3* ($\Delta ice3$). B) Western blotting para a detecção de ICE2-SM/HA de lisados de parasitos WT, $\Delta ice1$ e $\Delta ice3$. Ensaio de imunofluorescência (IFA) para a detecção de ICE2-SM/HA (vermelho) em vacúolos parasitóros (C) maduros ou (D) iniciais. A superfície dos parasitos foi evidenciada por anticorpos policlonais contra IMC6 (verde).

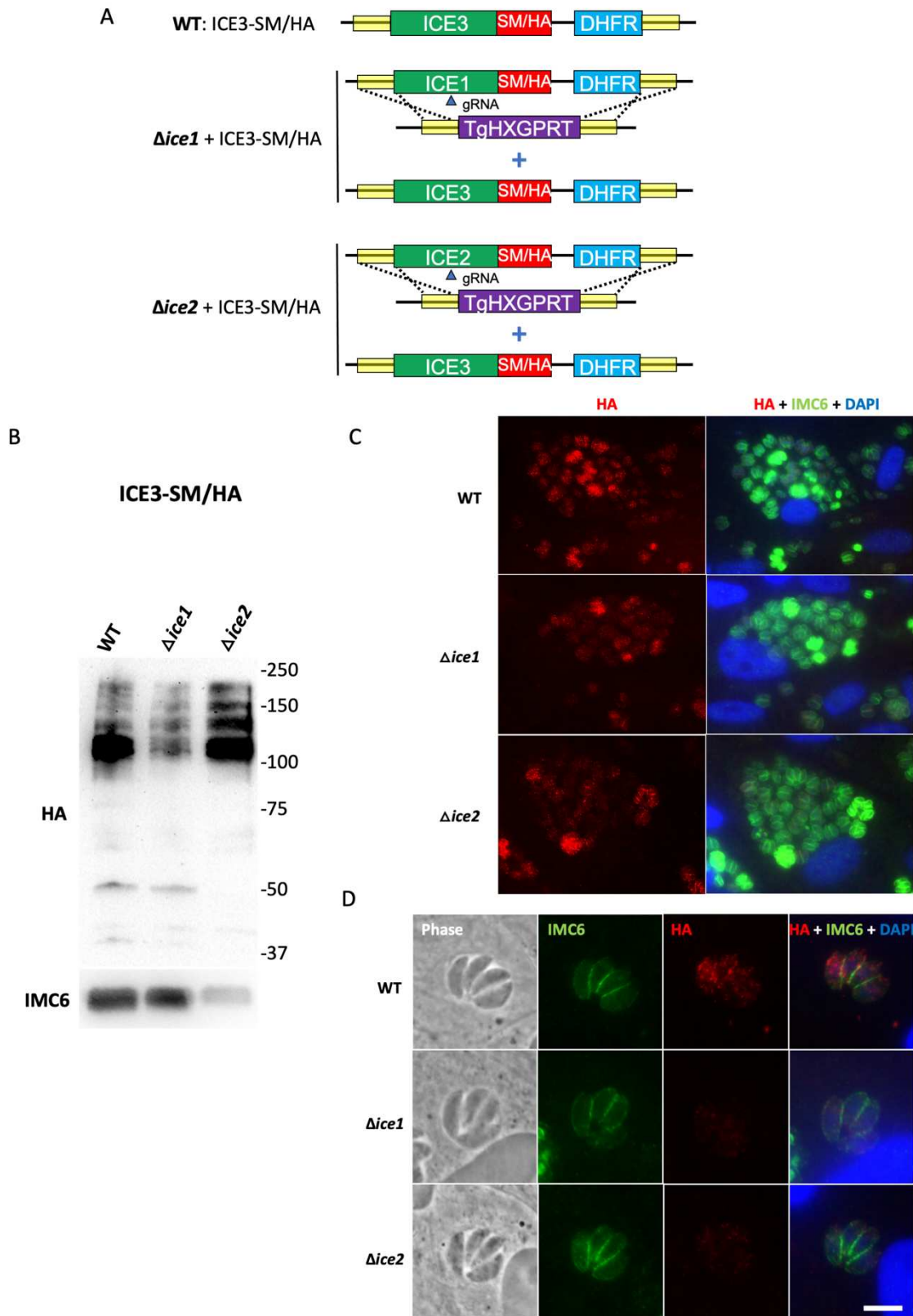


Figura 24: Avaliação do papel das proteínas de *T. gondii* que contêm domínios conservados de proteases p20 (ICE), para a expressão e correta localização de ICE3. A) Diagrama com a estratégia de depleções e fusão de etiqueta endógena à região C-terminal de ICE3 (ICE3-SM/HA), em parasitos selvagens (WT) ou geneticamente deficientes de *ICE1* ($\Delta ice1$) ou *ICE2* ($\Delta ice2$). B) Western blotting para a detecção de ICE3-SM/HA de lisados de parasitos WT, $\Delta ice1$ e $\Delta ice2$. Ensaio de imunofluorescência (IFA) para a detecção de ICE3-SM/HA (vermelho) em vacúolos parasitóros (C) maduros ou (D) iniciais. A superfície dos parasitos foi evidenciada por anticorpos policlonais contra IMC6 (verde).

Com a intenção de se verificar possíveis funções destas proteínas no contexto da sobrevivência dos parasitos e da interação entre estes e as células hospedeiras, realizamos primeiramente um ensaio para se verificar se a ausência destes genes prejudicaria a resistência destes parasitos a um conhecido mecanismo de proteção das células hospedeiras, a produção de óxido nítrico. Com tal finalidade, infectamos de modo pareado monocamadas de fibroblastos humanos (HFF) com os parasitos selvagens portando etiquetas de epítomos de hemaglutinina ou geneticamente deficientes nas ICEs, e tratamos estas células infectadas com um doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (SNP, 70 μ M), por 48h.

De forma geral, a exposição de monocamadas infectadas a 70 μ M de SNP por 48h tem pequeno efeito na quantidade e tamanho de vacúolos parasitóros de parasitos selvagens da cepa RH, uma vez que há a necessidade de um protocolo de tratamento mais prolongado para se notar redução na carga parasitária. Contudo, foi notável a queda do parasitismo de parasitos deficientes nos diferentes genes codificadores de ICEs quando tratados com SNP, principalmente nos parasitos $\Delta ice1$ (Figura 25). Apesar do perfil de redução dos vacúolos não ser tão pronunciado, também observamos um menor número de vacúolos contendo parasitos viáveis em células infectadas com taquizoítos geneticamente deficientes em *ICE2* ($\Delta ice2$, Figura 26) e *ICE3* ($\Delta ice3$, Figura 27), indicando que estes genes estão relacionados à persistência do parasito em células hospedeiras mediante resposta imune direcionada para sua eliminação.

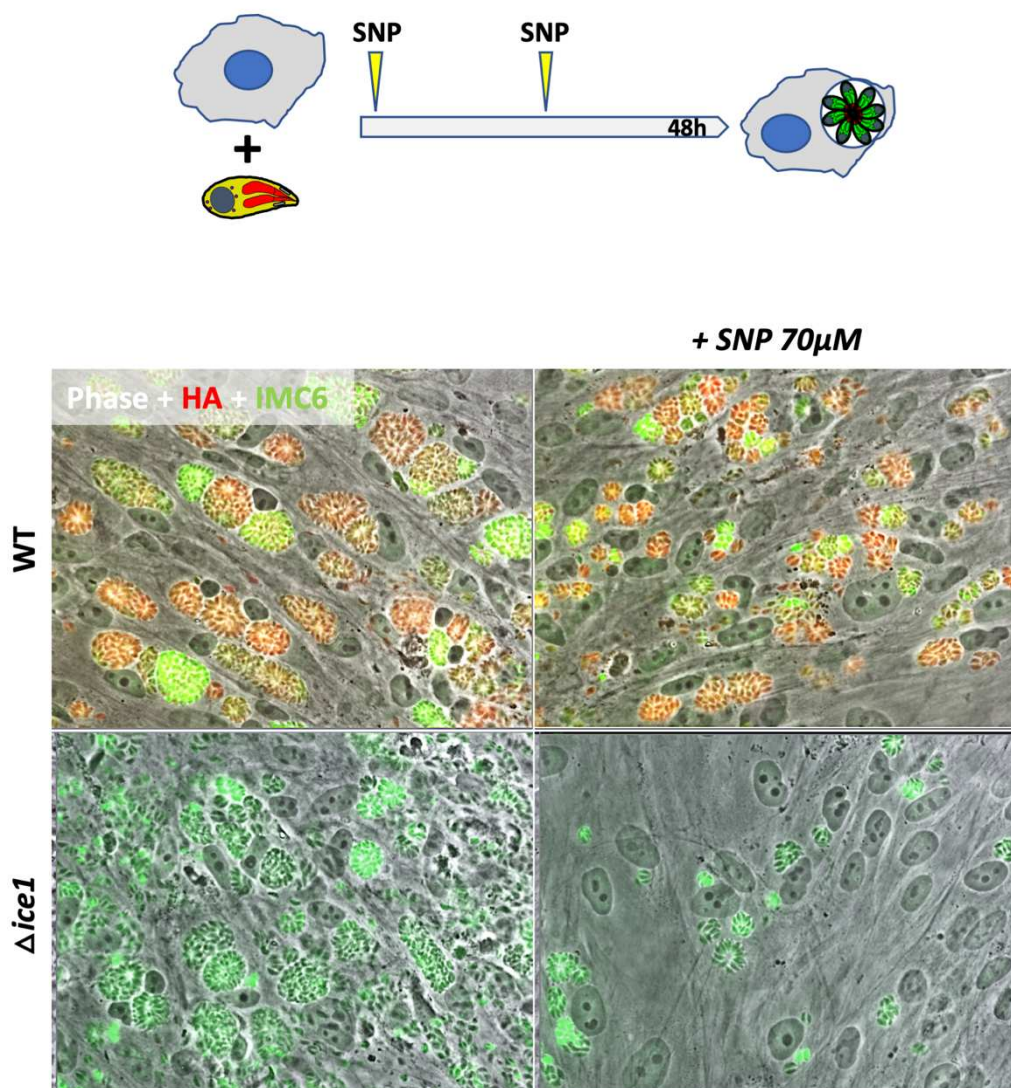


Figura 25: Perfil de resistência ao óxido nítrico de taquizoítos selvagens de *T. gondii* e geneticamente deficientes em *ICE1*. Monocamadas de HFF foram infectadas com as diferentes linhagens e tratadas a cada 24h com nitroprussiato de sódio (SNP, 70 μ M). No terceiro dia de infecção, as células foram submetidas a IFA para a marcação da superfície (IMC6, verde) e para a etiqueta endógena de HA fusionada a proteína de interesse (vermelho).

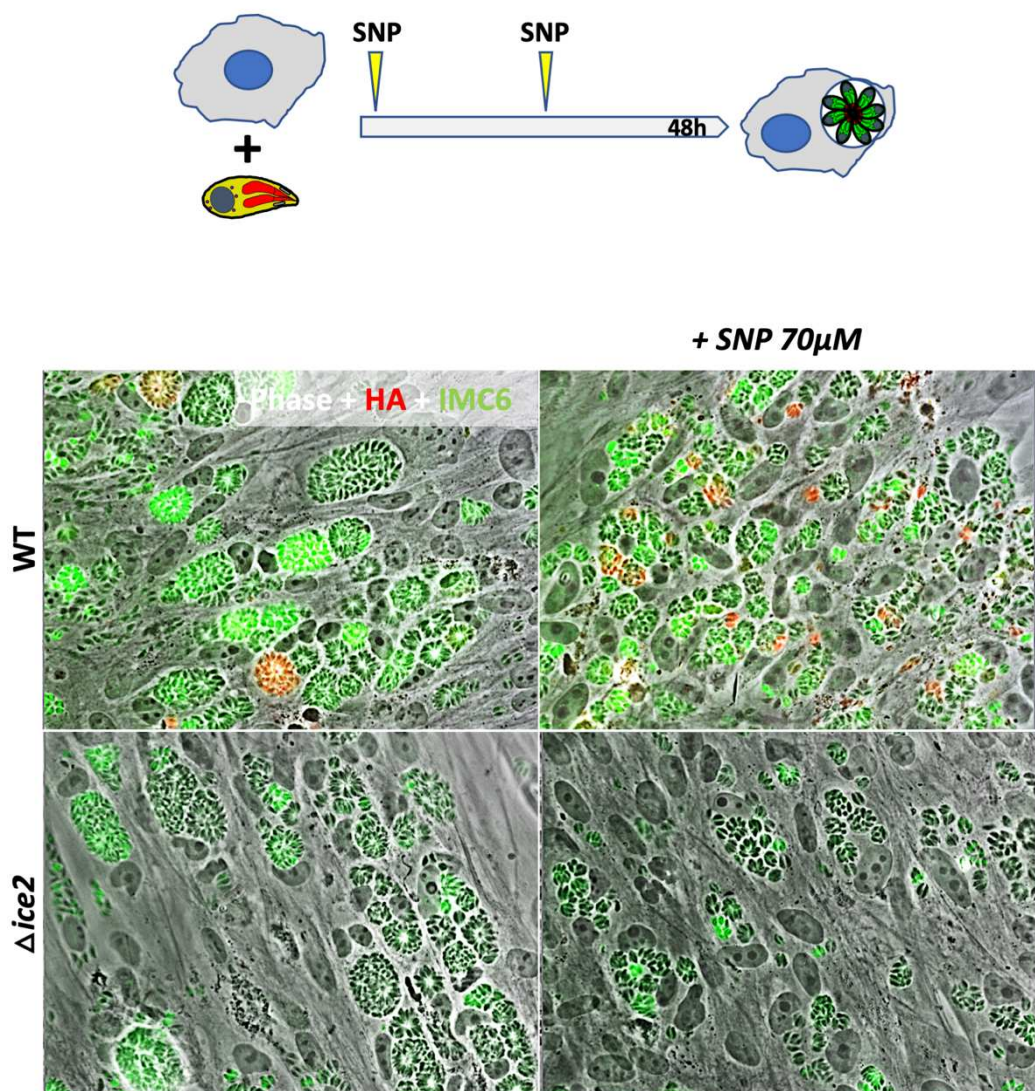


Figura 26: Perfil de resistência ao óxido nítrico de taquizoítos selvagens de *T. gondii* e geneticamente deficientes em *ICE2*. Monocamadas de HFF foram infectadas com as diferentes linhagens e tratadas a cada 24h com nitroprussiato de sódio (SNP, 70 μ M). No terceiro dia de infecção, as células foram submetidas a IFA para a marcação da superfície (IMC6, verde) e para a etiqueta endógena de HA fusionada a proteína de interesse (vermelho).

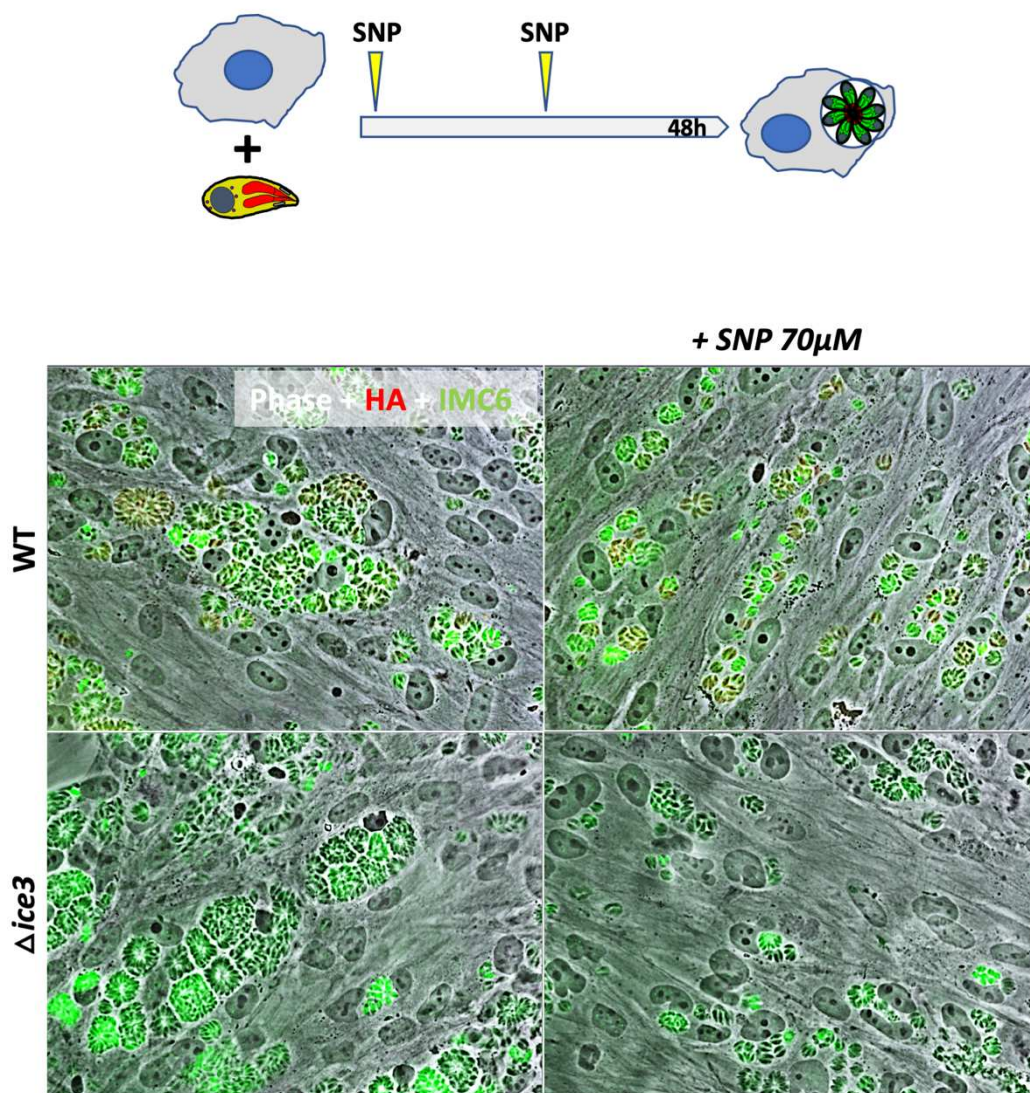


Figura 27: Perfil de resistência ao óxido nítrico de taquizoítos selvagens de *T. gondii* e geneticamente deficientes em *ICE3*. Monocamadas de HFF foram infectadas com as diferentes linhagens e tratadas a cada 24h com nitroprussiato de sódio (SNP, 70 μ M). No terceiro dia de infecção, as células foram submetidas a IFA para a marcação da superfície (IMC6, verde) e para a etiqueta endógena de HA fusionada a proteína de interesse (vermelho).

Dentro deste contexto, resolvemos mudar o sistema de análise e agora buscamos observar o efeito da presença destas proteínas na resposta imune gerada contra a infecção por *T. gondii*. Com esta intenção, utilizamos macrófagos diferenciados a partir de células pluripotentes obtidas de medula óssea de camundongos C57BL/6 (BMDM) e dosamos a produção de citocinas, além de observarmos o perfil de ativação do inflamassoma e da produção de espécies reativas de oxigênio mediante a infecção por parasitos selvagens e geneticamente deficientes nas ICEs. De forma notável, observamos que a ausência dos três genes codificadores de ICEs propiciou um aumento superior a 300% na produção da citocina IL-12 (Figura 28A), um importante indutor da resposta adaptativa de controle a infecção mediada por células T produtoras de IFN- γ . Observamos também um aumento significativo da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 em macrófagos infectados com taquizoítos $\Delta ice1$ (Figura 28B), bem como um aumento da concentração da citocina IL-1 β no sobrenadante de células infectadas com taquizoítos $\Delta ice2$ (Figura 28C), sugerindo um aumento da atividade do inflamassoma, responsável por clivar e consequentemente ativar esta citocina inflamatória.

Com base nestes achados, buscamos verificar o perfil de ativação do complexo do inflamassoma, por meio da oligomerização de um complexo enzimático intracitoplasmático composto por caspase-1 e caspase-11, por meio de uma sonda fluorescente (FAM-YVAD-FMK). Observamos que houve um aumento significativo na ativação do complexo do inflamassoma quando os BMDMs foram infectados com taquizoítos $\Delta ice2$ e $\Delta ice3$, se comparados aos parasitos WT (Figura 29A). Ainda, de forma a corroborar com estas observações, também dosamos por meio de sonda fluorescente (DHFC-DA) a acumulação de espécies reativas em células infectadas com as diferentes linhagens do parasito. O acúmulo de ROS é derivado do estresse oxidativo desencadeado pela infecção das células do hospedeiro e possuem mecanismo correlacionado à ativação do inflamassoma em células imunes. Novamente notamos um aumento significativo na expressão de ROS em BMDMs infectados com taquizoítos $\Delta ice2$ (Figura 29B), confirmando o fenótipo observado anteriormente.

Por fim, buscamos determinar se estas alterações na relação parasito-hospedeiro observadas nos experimentos *in vitro* seriam suficientes para influenciar diretamente a infecção pela cepa altamente virulenta de *T. gondii*, utilizando um modelo de infecção experimental em camundongos. Para tal, realizamos um protocolo de infecção IP com baixa carga de parasitos da cepa RH e dos parasitos geneticamente deficientes nas *ICEs* (10 taquizoítos), considerando que um único taquizoíto desta cepa é letal para camundongos em aproximadamente 3 semanas. Conforme inicialmente previsto, a infecção com os parasitos WT induziu a mortalidade de 100% do grupo experimental após 11 dias de infecção, induzindo uma rápida perda de peso destes animais entre os dias 6 e 9 de infecção (Figura 30).

Os camundongos infectados com taquizoítos $\Delta ice1$ seguiram padrão semelhante aos infectados com parasitos parentais: letalidade de todo o grupo dentro de 11 dias de infecção, com perda de peso significativa nos últimos dias de vida. Contudo, os grupos de camundongos infectados com parasitos $\Delta ice2$ e $\Delta ice3$ apresentaram um aumento significativo na sobrevivência, sendo que 50% dos camundongos infectados com parasitos geneticamente deficientes de *ICE2* sobreviveram, enquanto que todos os camundongos infectados com parasitos depletados de *ICE3* sobreviveram ao desafio, sem apresentarem perda de peso no decorrer do processo (Figura 30).

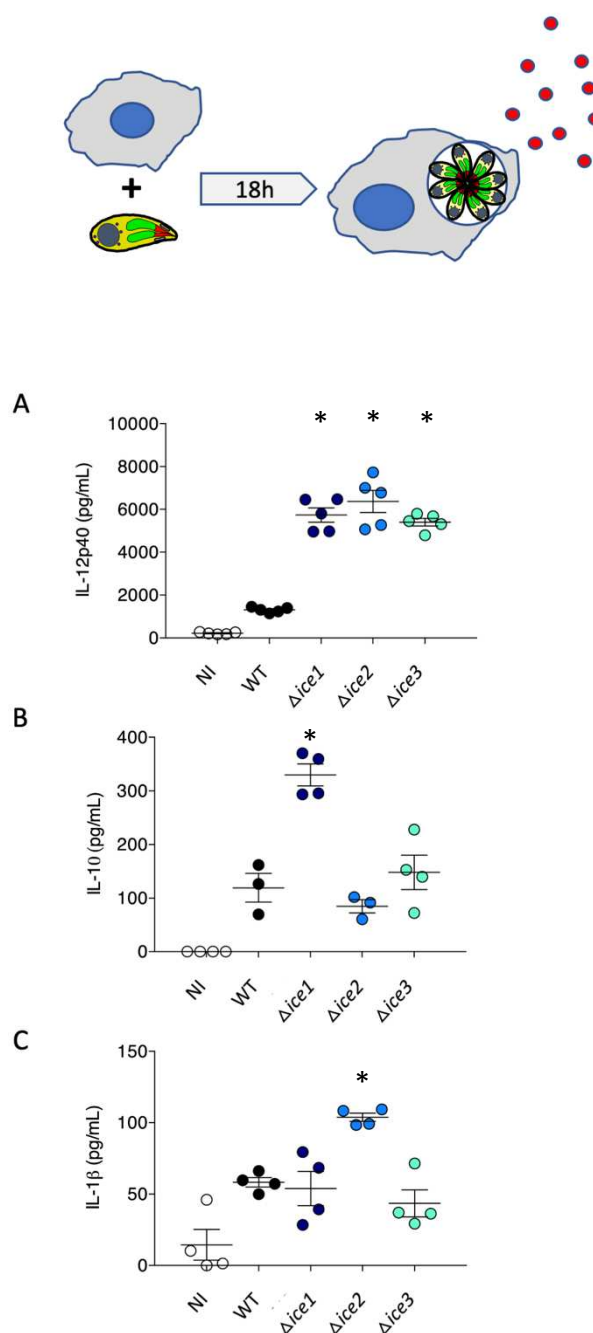


Figura 28: Avaliação da produção de (A) IL-12p40, (B) IL-10 e (C) IL-1 β em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6, infectados com taquizoítos selvagens da cepa RH de *T. gondii* (proporção 1:1 parasito/célula), ou geneticamente deficientes nos genes ortólogos às caspases (*ICE1*, *ICE2* e *ICE3*). * $p \leq 0,05$

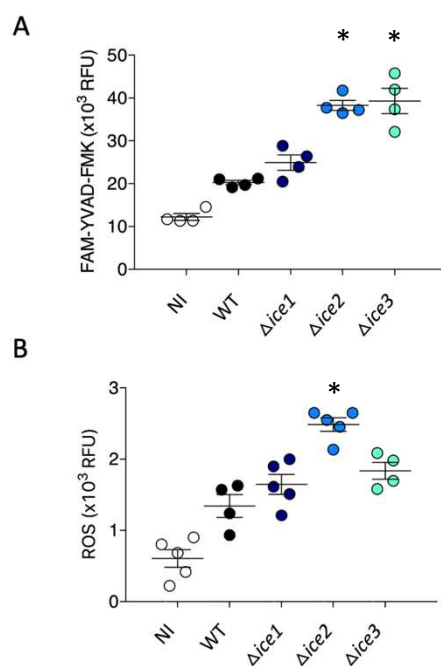
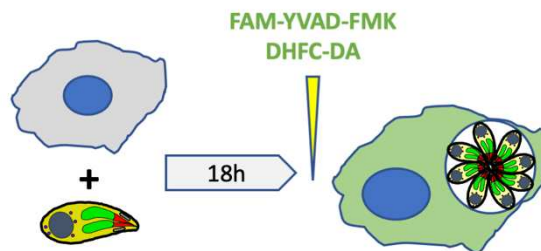


Figura 29: Avaliação da (A) ativação do complexo do Inflamassoma (FAM-YVAD-FMK) e (B) produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, DHFC-DA) em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6, infectados com taquizoítos selvagens da cepa RH de *T. gondii* (proporção 1:1 parasito/célula), ou geneticamente deficientes nos genes ortólogos às caspases (*ICE1*, *ICE2* e *ICE3*). * $p \leq 0,05$

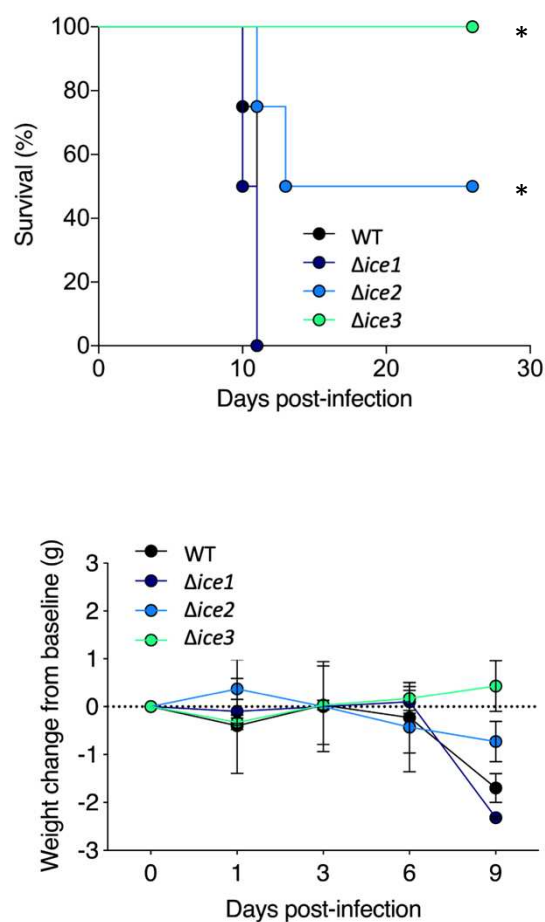


Figura 30: Curva de sobrevivência e de alterações de peso de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com 10 taquizoítos selvagens da cepa RH de *T. gondii*, ou geneticamente deficientes nos genes ortólogos às Caspases (*ICE1*, *ICE2* e *ICE3*). Os animais foram acompanhados por até 30 dias após a infecção e eutanasiados seguindo parâmetros pré-definidos, evitando-se sofrimento. * $p \leq 0,05$

5. DISCUSSÃO

A grande semelhança entre *T. gondii* e *N. caninum* oferece uma excelente oportunidade para explorar os fatores que são únicos para cada parasita e que provavelmente controlam a virulência dos parasitos, sua gama de hospedeiros dramaticamente diferente e a capacidade de realizar o ciclo sexual em hospedeiros distintos.

Para melhorar a manipulação genética em *N. caninum*, eliminamos a enzima Ku80 e descobrimos que fomos capazes de obter a marcação genética e geração de nocautes com alta eficiência quando realizados pela técnica de CRISPR/Cas9. A frequência de marcação e a facilidade de geração de nocautes genéticos completos (em vez de apenas inserções) com um gRNA e um template de reparo dirigido por homologia são semelhantes aos regularmente observados em *T. gondii*. Além disso, exploramos a seleção positiva e negativa de HXGPRT para gerar parasitas sem esse marcador selecionável (além de Ku80) para marcação rápida ou abordagens de nocaute. Juntos, estes dados sugerem que a recombinação em parasitas *NcLiv Δ h Δ k* é semelhante àquela observada em *T. gondii* e demonstram a utilidade desta linhagem base para manipulação genética em *N. caninum*.

Também demonstramos que a perda de Ku80 resulta na redução dramática do seu parceiro dímero Ku70, presumivelmente através da desestabilização e degradação da proteína. Em muitos parasitas *Δ ku80*, o Ku70 é indetectável, sugerindo que o nocaute do *Ku80* é essencialmente um nocaute duplo do dímero (que requer ambos os parceiros para funcionar). Isto é surpreendente, uma vez que *Ku70* foi anteriormente relatado como essencial em *T. gondii* (FOX *et al.*, 2009). No entanto, estes estudos foram feitos com ferramentas de nocaute iniciais que estavam em desenvolvimento, e o *score* de Ku70 (-0,75) no ensaio de triagem da essencialidade por CRISPR/Cas9 de todo o genoma sugere que é gene dispensável (SIDIK *et al.*, 2016). Uma degradação semelhante de um parceiro foi observada no complexo AC9/AC10/Erk7, onde o knockdown de AC10 resulta na perda completa de AC9 deste complexo, o que é essencial para a manutenção do conoide e liberação de organelas secretoras apicais (BACK *et*

al., 2020). Isto pode indicar que *T. gondii* possui um sistema robusto para eliminação de proteínas mal dobradas dentro do parasita, e essa capacidade parece preservada em *N. caninum*.

Dois dos genes que marcamos para fins de localização eram proteínas secretadas. Como esperado, GRA48 de *N. caninum* foi localizado no vacúolo, indicando que é uma proteína de grânulos densos como é observado em *T. gondii*, no qual foi descrito como sendo fosforilado no vacúolo parasitóforo por outra proteína secretada do *Toxoplasma*, a quinase residente no PV WNG1 (BERAKI *et al.*, 2019). Embora o TgGRA48 tenha sido localizado e demonstrado ser ativado por outra GRA, sua função no desenvolvimento de taquizoítos e/ou na interação com o hospedeiro ainda é desconhecida.

Buscamos estudos complementares para elucidar ainda mais o papel do GRA48 na biologia destes parasitos, com uma abordagem quer permitiu, ao menos parcialmente, uma comparação entre os ortólogos da proteína. Pelos nossos ensaios, GRA48 se mostrou uma proteína ubiquitariamente expressa em *T. gondii* e *N. caninum*, independentemente do estágio evolutivo em que os parasitos se encontram. Em contrapartida, GRA62 somente é detectada em parasitos que se encontram no estágio de taquizoítos, ou seja, durante o estágio de replicação ativa que corresponde com a expansão parasitária em um contexto de infecção. Associado a esta expressão estágio-específica, observamos também que a ausência desta molécula está relacionada a regulação negativa da produção de ROS e ao aumento do parasitismo do sistema nervoso central de camundongos durante a fase aguda da infecção. É coerente supormos que os parasitos produzem esta molécula durante sua fase de colonização dos tecidos para reduzir ativamente a oxidação produzida por células imunes levando, consequentemente, ao aumento da carga parasitária durante o processo de cronificação da infecção. Como se sabe, a produção de ROS é chave para o controle do parasitismo na fase aguda da infecção (DA SILVA *et al.*, 2017; MOTA *et al.*, 2020).

Aproveitando-se desta expressão constante de GRA48, com bom nível de proteína expresso durante toda a infecção de fibroblastos *in vitro*, bem como sua

localização no vacúolo parasitóforo, resolvemos utilizá-la como uma das proteínas 'isca' para desvendarmos o conteúdo de proteínas de grânulos densos de *N. caninum* por meio de ensaios de biotilação proximal associada a espectrometria de massas. Adicionamos a este contexto uma linhagem de *N. caninum* previamente gerada pelo grupo com outra finalidade (MOTA *et al.*, 2016) que recebeu uma inserção randômica da proteína GRA24 de *T. gondii* fusionada à etiqueta com BirA. Esta proteína não possui ortólogo em *Neospora* e sabidamente tem acesso ao citoplasma do hospedeiro, onde manipula diretamente p38 MAPK (BRAUN *et al.*, 2013). Conseguimos, associando ambos os ensaios, descrever a presença de mais de 50 GRAs de *Neospora* no vacúolo parasitóforo dos fibroblastos infectados, contribuindo de forma efetiva para a elaboração de um 'GRAoma' quantitativo deste parasito, que está servindo como um ponto de partida para os projetos de pesquisa do laboratório.

Acreditamos que as diferenças de número de peptídeos encontrados por alvo proteico sequenciado, bem como o número absoluto de proteínas encontradas nos ensaios realizados com GRA24 se deva a probabilidade de termos selecionado clone deste parasito com múltiplas cópias do plasmídeo codificador de TgGRA24_BirA inseridas ao longo de seu genoma, uma vez que se trata de uma inserção randômica (não dirigida), colaborando com uma expressão mais robusta da proteína e, conseqüentemente, com uma maior eficiência na identificação de proteínas proximais. Em adição, enquanto a 'isca' GRA48 recebeu uma marcação endógena, utilizando promotores gênicos e a expressão da própria proteína para promover a expressão de BirA e conseqüente marcação das demais proteínas por proximidade, a estratégia envolvendo a inserção de TgGRA24 utilizou a um promotor heterólogo na região 5' (NcGRA7) que induz altos níveis de expressão proteica.

Por outro lado, identificamos uma outra proteína secretada que também caracterizamos demonstrou ser também uma GRA. Inicialmente selecionamos NSG1 como alvo porque ele não era caracterizado e é encontrado somente em *Neospora*, sem nenhum ortólogo conhecido dentro da família Sarcocystidae. *N. caninum* não possui várias GRAs presentes em *T. gondii* que são conhecidos por modular as funções do hospedeiro, incluindo GRA15, GRA24, TEEGR, TgIST e

TgNSM (ROSENBERG; SIBLEY, 2021; SANGARÉ *et al.*, 2019). As GRAs de *Toxoplasma* que estão faltando em *Neospora* podem ser moléculas importantes que controlam a virulência do parasita ou o alcance do hospedeiro. No entanto, NSG1 é a primeira GRA de *Neospora* que está ausente em *T. gondii*, sugerindo que esta proteína efetora pode modular atividades específicas de *Neospora* no hospedeiro ou desempenhar alguma outra função no vacúolo do parasita.

A proteína NSG1 madura é composta em grande parte por repetições em tandem, que também estão presentes em várias proteínas secretadas por *Toxoplasma* (por exemplo, GRA16, MAG2, ROP1, TLN1). Embora essas repetições difiram em suas sequências e sejam tipicamente de função desconhecida, foi levantada a hipótese de que elas tenham uma função na invasão da célula hospedeira, na evasão imunológica e, em última análise, na virulência (GAO; WORTIS; PEREIRA, 2002; LIEW; MILLOTT; SCHMIDT, 1990; STAHL *et al.*, 1985). Será particularmente interessante avaliar se existe uma forte resposta imunitária ao NSG1, pois isto pode indicar um papel na imunidade. Além disso, o NSG1 pode servir como um antígeno único para fins de diagnóstico, que se centraram em grande parte na detecção de antígenos de superfície ou proteínas secretadas presentes em ambas as espécies que divergiram substancialmente para gerar respostas específicas do parasita (PEREIRA *et al.*, 2020; PINHEIRO *et al.*, 2013; YBAÑEZ *et al.*, 2013). Nesse sentido, é notável que se preveja que NSG1 tenha epítomos lineares de células B ao longo de toda a sua sequência, com altos escores de hidrofobicidade, acessibilidade e flexibilidade exatamente na região onde um dos conjuntos de repetições em tandem está concentrado. Estas características foram bem caracterizadas para esse fim em outros parasitas protozoários, como *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* (GOTO *et al.*, 2010; GOTO; CARTER; REED, 2008).

Além disso, modificamos a cepa NcLiv $\Delta h\Delta k$ com o sistema AID para a análise rápida de genes essenciais. Inicialmente expressamos Tir1 usando a construção de *T. gondii* que é dirigida a partir do promotor de tubulina, mas os parasitas tinham níveis variáveis de expressão, mesmo dentro de parasitas em um único vacúolo. Esta expressão variável de promotores de *T. gondii* em *Neospora* foi observada anteriormente no estudo de proteínas de ropria (BECKERS;

WAKEFIELD; JOINER, 1997) e foi resolvida utilizando o promotor GRA7 de *N. caninum*. A expressão variável sugere que pode ser uma melhor prática usar promotores de *Neospora* sempre que possível, embora os promotores de *Toxoplasma* tenham demonstrado ser bem sucedidos para muitos usos (ARRANZ-SOLÍS *et al.*, 2018; BECKERS; WAKEFIELD; JOINER, 1997; ZHANG *et al.*, 2010). O sistema AID em um parasito $\Delta ku80$ fornece assim um novo instrumento para knockdown condicional rápido e eficiente em *N. caninum*.

Esta utilidade foi comprovada durante a caracterização de NCLIV_049870 e seu ortólogo TGGT1_235420. Embora ainda não tenham sido completamente caracterizadas, estas proteínas nucleares são essenciais para o crescimento de ambos os parasitos dentro do vacúolo. Uma análise inicial destes genes mostra ortólogos em outras espécies dentro da família, e a sequência de aminoácidos prevista compartilha 60% de identidade entre *T. gondii* e *N. caninum*. Embora não existam motivos conservados definitivos nas proteínas que denotem uma função específica, a análise da sequência sugere o seu papel nuclear, provavelmente relacionado com a remodelação da cromatina.

A análise evolutiva indica que ambas as proteínas se originaram do ancestral *Sphaeroforma arctica*, que contém um domínio associado à helicase-SANT (HSA) que atuam como remodeladores da cromatina, ligando-se a proteínas nucleares relacionadas à actina (SZERLONG *et al.*, 2008). Embora este domínio não seja preservado em *T. gondii*, *N. caninum*, e nas espécies filogenéticas mais próximas, os ortólogos em *Cyclospora cayetanensis*, *Plasmodium* spp e *Cryptosporidium* spp ainda contêm o domínio HSA. Além disso, NCLIV_049870 é anotado como “GH22120, relacionado” no ToxoDB, referindo-se a uma proteína grimshawi de *Drosophila* com domínios repetidos semelhantes a mucina. Proteínas humanas contendo domínios como MUC-1C também estão envolvidas na remodelação da cromatina e são indicadores de progressão do câncer e resultados clínicos desfavoráveis (HATA *et al.*, 2019; YAMAMOTO *et al.*, 2019). Finalmente, a previsão do banco de dados String para parceiros funcionais dessas proteínas está toda relacionada à cromatina: TGME49_267800 (DRPA), TGME49_203950 (BDP), TGME49_289730 (Pep3/Vps18).

Caspases são as cisteína peptidases envolvidas em processos inflamatórios e na morte celular. Metacaspases, ortólogas às caspases, são encontradas em plantas, fungos e protozoários nos quais as caspases estão ausentes (UREN *et al.*, 2000). Metacaspases também pertencem a família C14, que exibe similaridade estrutural significativa e uma díade catalítica composta de cisteína e histidina compatível com as caspases (CARMONA-GUTIERREZ *et al.*, 2010). Há dois tipos de metacaspases podem ser distinguidos pelo prodomínio N-terminal, embora um terceiro tipo de metacaspase tenha sido descrito em fitoplâncton (CHOI; BERGES, 2013). As metacaspases do tipo I têm um prodomínio N-terminal, enquanto as metacaspases do tipo II não têm esse prodomínio, mas abrigam uma ligação entre os domínios p20 e p10 (TSIATSIANI *et al.*, 2011). Em protozoários e fungos, apenas as metacaspases do tipo I são encontradas. Em *T. gondii*, estudos anteriores mostraram que estas proteínas estão relacionadas ao processo de apoptose parasitário (LI *et al.*, 2015), de interconversão de taquizoítos para bradizoítos (SONG *et al.*, 2020), da maturação do complexo da membrana interna do parasito (LI *et al.*, 2021) e da formação de microporos voltados para a endocitose (KORENY *et al.*, 2023), processos estes que estão intimamente relacionados à sobrevivência do parasito, divisão celular, diferenciação de estágio e, consequentemente, sucesso do processo infeccioso.

Em nossos experimentos, mostramos primeiramente que a depleção dos genes que codificam as Caspases de *T. gondii* é viável, ou seja, não se trata de genes essenciais ao parasito, inclusive não influenciando na capacidade dos taquizoítos geneticamente deficientes em lisar as células hospedeiras na mesma velocidade dos parasitos não modificados. Esta informação contradiz a predição dos ensaios de triagem geral do genoma de *Toxoplasma* para genes essenciais por meio da técnica de CRISPR (SIDIK *et al.*, 2016), que definia que estes 3 genes seriam muito importantes para o processo de sobrevivência dos parasitos. Notamos também que há uma certa interdependência entre as diferentes caspases estudadas e o perfil de digestão das proteínas, sugerindo que as proteínas atuam eventualmente como enzimas ou como substrato entre si. O

mapeamento de sítios de clivagem nas ICEs e fragmentos gerados irá auxiliar no entendimento dos fenômenos aqui observados.

Contudo, as observações mais impactantes para nós foram relativas ao papel crucial que estas proteínas possuem na resistência contra mecanismos efetores do hospedeiro, bem como sua atuação na evasão de respostas imunes direcionadas para a eliminação do parasito. Os parasitos depletados dos genes codificadores das caspases se tornaram significativamente mais susceptíveis a quantidades relativamente baixas de óxido nítrico, um dos mecanismos efetores mais eficientes das células imunes contra a infecção por estes protozoários (BARROS *et al.*, 2019; WOODMAN; DIMIER; BOUT, 1991). Em adição, a ausência destas proteínas levou a um desbalanço no perfil inflamatório de macrófagos infectados, com um aumento da produção de fatores-chave para a eliminação do parasito como IL-12, Caspase-1/IL-1 β e ROS, o que sugere que o parasito utiliza estas moléculas para evadir as respostas imunes montadas para sua eliminação. A descrição dos mecanismos moleculares envolvidos nestes processos pode gerar estratégias eficientes para o controle ou tratamento destas infecções.

6. CONCLUSÕES

Por meio da execução deste projeto, podemos concluir que a genética molecular fornece abordagens investigativas poderosas que podem melhorar muito a nossa compreensão dos patógenos intracelulares e suas interações com as células hospedeiras. De forma específica:

- Este estudo melhora de drasticamente a capacidade de manipulação genética de *N. caninum*, agora com diversidade compatível com as ferramentas disponíveis para *T. gondii*.
- Com estas ferramentas a nossa disposição, fomos capazes de descrever novas proteínas de *N. caninum*, localizando-as e as caracterizando dentro do contexto de interação com as células hospedeiras.
- Estabelecemos um modelo de estudo utilizando a modificação genômica para comparar o conteúdo proteico destes parasitos e, desta maneira, buscar fatores de virulência que podem ser passíveis de intervenção comum.
- Contribuímos com o estabelecimento do 'GRAoma' (mapeamento proteômico das proteínas de Granulos Densos) de *N. caninum*., por meio dos ensaios de biotinilação por proximidade.
- Verificamos que proteínas ortólogas de caspases são relevantes para em *T. gondii* se manter viável nas células dos hospedeiros, em um processo que envolve a modulação negativa do inflamassoma do hospedeiro e da produção de ROS.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, L. B.; HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; KRAHENBUHL, J. L. Microbiostatic Effect of Murine-Activated Macrophages for *Toxoplasma Gondii*. Role for Synthesis of Inorganic Nitrogen Oxides from L-Arginine. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 144, n. 7, p. 2725–2729, 1 abr. 1990.

ANDRADE, G. M. Q.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; CARELLOS, E. V. M.; ROMANELLI, R. M. C.; VITOR, R. W. A.; CARNEIRO, A. C. A. V.; JANUARIO, J. N. Congenital Toxoplasmosis from a Chronically Infected Woman with Reactivation of Retinochoroiditis during Pregnancy. **Jornal De Pediatria**, v. 86, n. 1, p. 85–88, 2010.

ANDREOTTI, R.; BARROS, J. C.; PEREIRA, A. R.; OSHIRO, L. M.; CUNHA, R. C.; FIGUEIREDO NETO, L. F. Association between Seropositivity for *Neospora Caninum* and Reproductive Performance of Beef Heifers in the Pantanal of Mato Grosso Do Sul, Brazil. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Orgao Oficial Do Colegio Brasileiro De Parasitologia Veterinaria**, v. 19, n. 2, p. 119–123, 2010.

ARRANZ-SOLÍS, D.; REGIDOR-CERRILLO, J.; LOURIDO, S.; ORTEGA-MORA, L. M.; SAEIJ, J. P. J. *Toxoplasma* CRISPR/Cas9 Constructs Are Functional for Gene Disruption in *Neospora Caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 48, n. 8, p. 597–600, jul. 2018.

BACK, P. S.; O'SHAUGHNESSY, W. J.; MOON, A. S.; DEWANGAN, P. S.; HU, X.; SHA, J.; WOHLSCHEGEL, J. A.; BRADLEY, P. J.; REESE, M. L. Ancient MAPK ERK7 Is Regulated by an Unusual Inhibitory Scaffold Required for *Toxoplasma* Apical Complex Biogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 22, p. 12164–12173, 2 jun. 2020.

BARROS, P. da S. C.; MOTA, C. M.; MIRANDA, V. D. S.; FERREIRA, F. B.; RAMOS, E. L. P.; SANTANA, S. S.; COSTA, L. F.; MARQUES PAJUABA, A. C. A.; ROBERTO MINEO, J.; MINEO, T. W. P. Inducible Nitric Oxide Synthase Is Required for Parasite Restriction and Inflammatory Modulation during *Neospora Caninum* Infection. **Veterinary Parasitology**, v. 276, p. 108990, dez. 2019.

BARYLYUK, K.; KORENY, L.; KE, H.; BUTTERWORTH, S.; CROOK, O. M.; LASSADI, I.; GUPTA, V.; TROMER, E.; MOURIER, T.; STEVENS, T. J.; BRECKELS, L. M.; PAIN, A.; LILLEY, K. S.; WALLER, R. F. A Comprehensive Subcellular Atlas of the *Toxoplasma* Proteome via hyperLOPIT Provides Spatial Context for Protein Functions. **Cell Host & Microbe**, v. 28, n. 5, p. 752–766.e9, 11 nov. 2020.

BECKERS, C. J.; WAKEFIELD, T.; JOINER, K. A. The Expression of *Toxoplasma* Proteins in *Neospora Caninum* and the Identification of a Gene Encoding a Novel Rhoptry Protein. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 209–223, nov. 1997.

BERAKI, T.; HU, X.; BRONCEL, M.; YOUNG, J. C.; O'SHAUGHNESSY, W. J.; BOREK, D.; TREECK, M.; REESE, M. L. Divergent Kinase Regulates Membrane Ultrastructure of the Toxoplasma Parasitophorous Vacuole. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 13, p. 6361–6370, 26 mar. 2019.

BEVERLEY, J. K. Congenital Toxoplasma Infections. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v. 53, n. 2, p. 111–113, fev. 1960.

BIERLY, A. L.; SHUFESKY, W. J.; SUKHUMAVASI, W.; MORELLI, A. E.; DENKERS, E. Y. Dendritic Cells Expressing Plasmacytoid Marker PDCA-1 Are Trojan Horses during Toxoplasma Gondii Infection. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 181, n. 12, p. 8485–8491, 15 dez. 2008.

BOAS, R. V.; PACHECO, T. dos A.; MELO, A. L. T.; DE OLIVEIRA, A. C. S.; DE AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. de C. Infection by Neospora Caninum in Dairy Cattle Belonging to Family Farmers in the Northern Region of Brazil. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Orgao Oficial Do Colegio Brasileiro De Parasitologia Veterinaria**, v. 24, n. 2, p. 204–208, 2015.

BOOTHROYD, J. C. What a Difference 30 Years Makes! A Perspective on Changes in Research Methodologies Used to Study Toxoplasma Gondii. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 2071, p. 1–25, 2020.

BRAUN, L.; BRENIER-PINCHART, M.-P.; YOGAVEL, M.; CURT-VARESANO, A.; CURT-BERTINI, R.-L.; HUSSAIN, T.; KIEFFER-JAQUINOD, S.; COUTE, Y.; PELLOUX, H.; TARDIEUX, I.; SHARMA, A.; BELRHALLI, H.; BOUGDOUR, A.; HAKIMI, M.-A. A Toxoplasma Dense Granule Protein, GRA24, Modulates the Early Immune Response to Infection by Promoting a Direct and Sustained Host P38 MAPK Activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 10, p. 2071–2086, 23 set. 2013.

BROWN, K. M.; LONG, S.; SIBLEY, L. D. Conditional Knockdown of Proteins Using Auxin-Inducible Degron (AID) Fusions in Toxoplasma Gondii. **Bio-Protocol**, v. 8, n. 4, p. e2728, 20 fev. 2018.

CANTÓN, G. J.; MORENO, F.; FIORENTINO, M. A.; HECKER, Y. P.; SPETTER, M.; FIORANI, F.; MONTERUBBIANESI, M. G.; GARCÍA, J. A.; ALTAMIRANDA, E. G.; CIRONE, K. M.; LOUGE URIARTE, E. L.; VERNA, A. E.; MARIN, M.; CHEUQUEPÁN, F.; MALENA, R.; MORSELLA, C.; PAOLICCHI, F. A.; MORRELL, E. L.; MOORE, D. P. Spatial-Temporal Trends and Economic Losses Associated with Bovine Abortifacients in Central Argentina. **Tropical Animal Health and Production**, v. 54, n. 4, p. 242, 30 jul. 2022.

CARMONA-GUTIERREZ, D.; FRÖHLICH, K.-U.; KROEMER, G.; MADEO, F. Metacaspases Are Caspases. Doubt No More. **Cell Death and Differentiation**, v. 17, n. 3, p. 377–378, mar. 2010.

CHOI, C. J.; BERGES, J. A. New Types of Metacaspases in Phytoplankton Reveal Diverse Origins of Cell Death Proteases. **Cell Death & Disease**, v. 4, n. 2, p. e490, 14 fev. 2013.

COLLANTES-FERNANDEZ, E.; ARRIGHI, R. B. G.; ALVAREZ-GARCÍA, G.; WEIDNER, J. M.; REGIDOR-CERRILLO, J.; BOOTHROYD, J. C.; ORTEGA-MORA, L. M.; BARRAGAN, A. Infected Dendritic Cells Facilitate Systemic Dissemination and Transplacental Passage of the Obligate Intracellular Parasite *Neospora Caninum* in Mice. **PloS One**, v. 7, n. 3, p. e32123, 2012.

CYGAN, A. M.; THEISEN, T. C.; MENDOZA, A. G.; MARINO, N. D.; PANAS, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Co-immunoprecipitation with MYR1 identifies three additional proteins within the *Toxoplasma* parasitophorous vacuole required for translocation of dense granule effectors into host cells. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/867788>>.

DA SILVA, M. V.; FERREIRA FRANÇA, F. B.; MOTA, C. M.; DE MACEDO JÚNIOR, A. G.; RAMOS, E. L. P.; SANTIAGO, F. M.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. P. Dectin-1 Compromises Innate Responses and Host Resistance against *Neospora Caninum* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 245, 2017.

DARNELL, J. E.; KERR, I. M.; STARK, G. R. Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. **Science (New York, N.Y.)**, v. 264, n. 5164, p. 1415–1421, 3 jun. 1994.

DAVOLI-FERREIRA, M.; FONSECA, D. M.; MOTA, C. M.; DIAS, M. S.; LIMA-JUNIOR, D. S.; DA SILVA, M. V.; QUIRINO, G. F. S.; ZAMBONI, D. S.; SILVA, J. S.; MINEO, T. W. P. Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Containing Protein 2 Prompts Potent Inflammatory Stimuli during *Neospora Caninum* Infection. **Scientific Reports**, v. 6, p. 29289, 5 jul. 2016.

DESMONTS, G.; COUVREUR, J. [Natural history of congenital toxoplasmosis]. **Annales De Pédiatrie**, v. 31, n. 10, p. 799–802, nov. 1984.

DI CRISTINA, M.; CARRUTHERS, V. B. New and Emerging Uses of CRISPR/Cas9 to Genetically Manipulate Apicomplexan Parasites. **Parasitology**, v. 145, n. 9, p. 1119–1126, ago. 2018.

DONALD, R. G.; CARTER, D.; ULLMAN, B.; ROOS, D. S. Insertional Tagging, Cloning, and Expression of the *Toxoplasma Gondii* Hypoxanthine-Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase Gene. Use as a Selectable Marker for Stable Transformation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 24, p. 14010–14019, 14 jun. 1996.

DONALD, R. G.; ROOS, D. S. Stable Molecular Transformation of *Toxoplasma Gondii*: A Selectable Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase Marker Based on Drug-Resistance Mutations in Malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 24, p. 11703–11707, 15 dez. 1993.

DONG, J.; ZHANG, N.; ZHAO, P.; LI, J.; CAO, L.; WANG, X.; LI, X.; YANG, J.; ZHANG, X.; GONG, P. Disruption of Dense Granular Protein 2 (GRA2)

Decreases the Virulence of *Neospora Caninum*. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 634612, 2021.

DUTRA, M. S.; BÉLA, S. R.; PEIXOTO-RANGEL, A. L.; FAKIOLA, M.; CRUZ, A. G.; GAZZINELLI, A.; QUITES, H. F.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; PEIXE, R. G.; CAMPOS, W. R.; HIGINO-ROCHA, A. C.; MILLER, N. E.; BLACKWELL, J. M.; ANTONELLI, L. R.; GAZZINELLI, R. T. Association of a NOD2 Gene Polymorphism and T-Helper 17 Cells with Presumed Ocular Toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 1, p. 152–163, 1 jan. 2013.

EMINI, E. A.; HUGHES, J. V.; PERLOW, D. S.; BOGER, J. Induction of Hepatitis A Virus-Neutralizing Antibody by a Virus-Specific Synthetic Peptide. **Journal of Virology**, v. 55, n. 3, p. 836–839, set. 1985.

FOX, B. A.; RISTUCCIA, J. G.; GIGLEY, J. P.; BZIK, D. J. Efficient Gene Replacements in *Toxoplasma Gondii* Strains Deficient for Nonhomologous End Joining. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 4, p. 520–529, abr. 2009.

FRANCO, M.; PANAS, M. W.; MARINO, N. D.; LEE, M.-C. W.; BUCHHOLZ, K. R.; KELLY, F. D.; BEDNARSKI, J. J.; SLECKMAN, B. P.; POURMAND, N.; BOOTHROYD, J. C. A Novel Secreted Protein, MYR1, Is Central to *Toxoplasma*'s Manipulation of Host Cells. **mBio**, v. 7, n. 1, p. e02231- 02215, 2 fev. 2016.

FRANCO, M.; SHASTRI, A. J.; BOOTHROYD, J. C. Infection by *Toxoplasma Gondii* Specifically Induces Host C-Myc and the Genes This Pivotal Transcription Factor Regulates. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 4, p. 483–493, abr. 2014.

GAO, W.; WORTIS, H. H.; PEREIRA, M. A. The *Trypanosoma Cruzi* Trans-Sialidase Is a T Cell-Independent B Cell Mitogen and an Inducer of Non-Specific Ig Secretion. **International Immunology**, v. 14, n. 3, p. 299–308, mar. 2002.

GAZZINELLI, R. T.; HIENY, S.; WYNN, T. A.; WOLF, S.; SHER, A. Interleukin 12 Is Required for the T-Lymphocyte-Independent Induction of Interferon Gamma by an Intracellular Parasite and Induces Resistance in T-Cell-Deficient Hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 13, p. 6115–6119, 1 jul. 1993.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E. Y.; HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Parasite-Induced IL-12 Stimulates Early IFN-Gamma Synthesis and Resistance during Acute Infection with *Toxoplasma Gondii*. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 153, n. 6, p. 2533–2543, 15 set. 1994.

GOLD, D. A.; KAPLAN, A. D.; LIS, A.; BETT, G. C. L.; ROSOWSKI, E. E.; CIRELLI, K. M.; BOUGDOUR, A.; SIDIK, S. M.; BECK, J. R.; LOURIDO, S.; EGEE, P. F.; BRADLEY, P. J.; HAKIMI, M. A.; RASMUSSEN, R. L.; SAEIJ, J. P. J. The *Toxoplasma* dense granule proteins GRA17 and GRA23 mediate the movement of small molecules between the host and the parasitophorous vacuole. **Cell Host and Microbe**, v. 17, n. 5, p. 642–652, maio 2015.

GOTO, Y.; CARTER, D.; GUDERIAN, J.; INOUE, N.; KAWAZU, S.-I.; REED, S. G. Upregulated Expression of B-Cell Antigen Family Tandem Repeat Proteins by

Leishmania Amastigotes. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 5, p. 2138–2145, maio 2010.

GOTO, Y.; CARTER, D.; REED, S. G. Immunological Dominance of Trypanosoma Cruzi Tandem Repeat Proteins. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 3967–3974, set. 2008.

GOV, L.; KARIMZADEH, A.; UENO, N.; LODOEN, M. B. Human Innate Immunity to Toxoplasma Gondii Is Mediated by Host Caspase-1 and ASC and Parasite GRA15. **mBio**, v. 4, n. 4, p. e00255-13, 9 jul. 2013.

GUEVARA, R. B.; FOX, B. A.; BZIK, D. J. Succinylated Wheat Germ Agglutinin Colocalizes with the Toxoplasma Gondii Cyst Wall Glycoprotein CST1. **mSphere**, v. 5, n. 2, p. e00031-20, 4 mar. 2020.

GUIMARÃES, A. L.; RICHER ARAUJO COELHO, D.; SCORIELS, L.; MAMBRINI, J.; RIBEIRO DO VALLE ANTONELLI, L.; HENRIQUES, P.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ASSIS MARTINS FILHO, O.; MINEO, J.; BAHIA-OLIVEIRA, L.; PANIZZUTTI, R. Effects of Toxoplasma Gondii Infection on Cognition, Symptoms, and Response to Digital Cognitive Training in Schizophrenia. **Schizophrenia (Heidelberg, Germany)**, v. 8, n. 1, p. 104, 25 nov. 2022.

HATA, T.; RAJABI, H.; TAKAHASHI, H.; YASUMIZU, Y.; LI, W.; JIN, C.; LONG, M. D.; HU, Q.; LIU, S.; FUSHIMI, A.; YAMASHITA, N.; KUI, L.; HONG, D.; YAMAMOTO, M.; MIYO, M.; HIRAKI, M.; MAEDA, T.; SUZUKI, Y.; SAMUR, M. K.; KUFÉ, D. MUC1-C Activates the NuRD Complex to Drive Dedifferentiation of Triple-Negative Breast Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 79, n. 22, p. 5711–5722, 15 nov. 2019.

HOWE, D. K.; MERCIER, C.; MESSINA, M.; SIBLEY, L. D. Expression of Toxoplasma Gondii Genes in the Closely-Related Apicomplexan Parasite Neospora Caninum. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 86, n. 1, p. 29–36, maio 1997.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. Development of Molecular Genetics for Neospora Caninum: A Complementary System to Toxoplasma Gondii. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 13, n. 2, p. 123–133, out. 1997.

HUNTER, C. A.; SUBAUSTE, C. S.; VAN CLEAVE, V. H.; REMINGTON, J. S. Production of Gamma Interferon by Natural Killer Cells from Toxoplasma Gondii-Infected SCID Mice: Regulation by Interleukin-10, Interleukin-12, and Tumor Necrosis Factor Alpha. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 7, p. 2818–2824, jul. 1994.

HUYNH, M.-H.; CARRUTHERS, V. B. Tagging of Endogenous Genes in a Toxoplasma Gondii Strain Lacking Ku80. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 4, p. 530–539, abr. 2009.

JESPERSEN, M. C.; PETERS, B.; NIELSEN, M.; MARCATILI, P. BepiPred-2.0: Improving Sequence-Based B-Cell Epitope Prediction Using Conformational Epitopes. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W24–W29, 3 jul. 2017.

KARPLUS, P. A.; SCHULZ, G. E. Prediction of Chain Flexibility in Proteins. **Naturwissenschaften**, v. 72, n. 4, p. 212–213, 1 abr. 1985.

KODJIKIAN, L. [Toxoplasmosis and pregnancy]. **Journal Francais D'ophtalmologie**, v. 33, n. 5, p. 362–367, maio 2010.

KORENY, L.; MERCADO-SAAVEDRA, B. N.; KLINGER, C. M.; BARYLYUK, K.; BUTTERWORTH, S.; HIRST, J.; RIVERA-CUEVAS, Y.; ZACCAI, N. R.; HOLZER, V. J. C.; KLINGL, A.; DACKS, J. B.; CARRUTHERS, V. B.; ROBINSON, M. S.; GRAS, S.; WALLER, R. F. Stable Endocytic Structures Navigate the Complex Pellicle of Apicomplexan Parasites. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 2167, 15 abr. 2023.

LEI, T.; WANG, H.; LIU, J.; NAN, H.; LIU, Q. ROP18 Is a Key Factor Responsible for Virulence Difference between *Toxoplasma Gondii* and *Neospora Caninum*. **PloS One**, v. 9, n. 6, p. e99744, 2014.

LI, M.; LIU, J.; WU, Y.; WU, Y.; SUN, X.; FU, Y.; ZHANG, X.; LIU, Q. Requirement of *Toxoplasma Gondii* Metacaspases for IMC1 Maturation, Endodyogeny and Virulence in Mice. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 400, 12 ago. 2021.

LI, M.; WANG, H.; LIU, J.; HAO, P.; MA, L.; LIU, Q. The Apoptotic Role of Metacaspase in *Toxoplasma Gondii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1560, 2015.

LIEW, F. Y.; MILLOTT, S. M.; SCHMIDT, J. A. A Repetitive Peptide of *Leishmania* Can Activate T Helper Type 2 Cells and Enhance Disease Progression. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 172, n. 5, p. 1359–1365, 1 nov. 1990.

LILUE, J.; MÜLLER, U. B.; STEINFELDT, T.; HOWARD, J. C. Reciprocal Virulence and Resistance Polymorphism in the Relationship between *Toxoplasma Gondii* and the House Mouse. **eLife**, v. 2, p. e01298, 29 out. 2013.

MACMICKING, J. D. Interferon-Inducible Effector Mechanisms in Cell-Autonomous Immunity. **Nature Reviews. Immunology**, v. 12, n. 5, p. 367–382, 25 abr. 2012.

MAIA, A. R. A.; DE MELO, R. P. B.; MOTA, R. A.; CLEMENTINO, I. J.; ALVES, C. J.; DE SOUSA AMÉRICO BATISTA SANTOS, C.; FERNANDES, L. G.; DE AZEVEDO, S. S. Herd and Animal Level Prevalences and Risk Factors for *Neospora Caninum* Infection in Cattle in the State of Paraíba, Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports**, v. 40, p. 100866, maio 2023.

MARIM, F. M.; SILVEIRA, T. N.; LIMA, D. S.; ZAMBONI, D. S. A Method for Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages from Cryopreserved Mouse Bone Marrow Cells. **PloS One**, v. 5, n. 12, p. e15263, 17 dez. 2010.

MASHAYEKHI, M.; SANDAU, M. M.; DUNAY, I. R.; FRICKEL, E. M.; KHAN, A.; GOLDSZMID, R. S.; SHER, A.; PLOEGH, H. L.; MURPHY, T. L.; SIBLEY, L. D.; MURPHY, K. M. CD8 α (+) Dendritic Cells Are the Critical Source of Interleukin-12

That Controls Acute Infection by Toxoplasma Gondii Tachyzoites. **Immunity**, v. 35, n. 2, p. 249–259, 26 ago. 2011.

MINEO, T. W. P.; ALENIUS, S.; NÄSLUND, K.; MONTASSIER, H. J.; BJÖRKMAN, C. Distribution of Antibodies against Neospora Caninum, BVDV and BHV-1 among Cows in Brazilian Dairy Herds with Reproductive Disorders. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Orgao Oficial Do Colegio Brasileiro De Parasitologia Veterinaria**, v. 15, n. 4, p. 188–192, 2006.

MINEO, T. W. P.; BENEVIDES, L.; SILVA, N. M.; SILVA, J. S. Myeloid Differentiation Factor 88 Is Required for Resistance to Neospora Caninum Infection. **Veterinary Research**, v. 40, n. 4, p. 32, 2009.

MINEO, T. W. P.; OLIVEIRA, C. J. F.; GUTIERREZ, F. R. S.; SILVA, J. S. Recognition by Toll-like Receptor 2 Induces Antigen-Presenting Cell Activation and Th1 Programming during Infection by Neospora Caninum. **Immunology and Cell Biology**, v. 88, n. 8, p. 825–833, 2010.

MITCHELL, C. D.; ERLICH, S. S.; MASTRUCCI, M. T.; HUTTO, S. C.; PARKS, W. P.; SCOTT, G. B. Congenital Toxoplasmosis Occurring in Infants Perinatally Infected with Human Immunodeficiency Virus 1. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 9, n. 7, p. 512–518, jul. 1990.

MOTA, C. M.; LIMA-JUNIOR, D. de S.; FERREIRA FRANÇA, F. B.; AGUILLÓN TORRES, J. D.; BARROS, P. da S. C.; SANTIAGO, F. M.; SILVA, J. S.; MINEO, J. R.; ZAMBONI, D. S.; MINEO, T. W. P. Interplay Between Reactive Oxygen Species and the Inflammasome Are Crucial for Restriction of Neospora Caninum Replication. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 243, 2020.

MOTA, C. M.; OLIVEIRA, A. C. M.; DAVOLI-FERREIRA, M.; SILVA, M. V.; SANTIAGO, F. M.; NADIPURAM, S. M.; VASHISHT, A. A.; WOHLSCHLEGEL, J. A.; BRADLEY, P. J.; SILVA, J. S.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. P. Neospora caninum Activates p38 MAPK as an Evasion Mechanism against Innate Immunity. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01456>>. Acesso em: 8 out. 2023.

MURRAY, H. W.; RUBIN, B. Y.; CARRIERO, S. M.; HARRIS, A. M.; JAFFEE, E. A. Human Mononuclear Phagocyte Antiprotozoal Mechanisms: Oxygen-Dependent vs Oxygen-Independent Activity against Intracellular Toxoplasma Gondii. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 134, n. 3, p. 1982–1988, mar. 1985.

NADIPURAM, S. M.; THIND, A. C.; RAYATPISHEH, S.; WOHLSCHLEGEL, J. A.; BRADLEY, P. J. Proximity Biotinylation Reveals Novel Secreted Dense Granule Proteins of Toxoplasma Gondii Bradyzoites. **PloS One**, v. 15, n. 5, p. e0232552, 2020a.

NADIPURAM, S. M.; THIND, A. C.; RAYATPISHEH, S.; WOHLSCHEGEL, J. A.; BRADLEY, P. J. Proximity Biotinylation Reveals Novel Secreted Dense Granule Proteins of Toxoplasma Gondii Bradyzoites. **PloS One**, v. 15, n. 5, p. e0232552, 2020b.

NAYERI, T.; MOOSAZADEH, M.; SARVI, S.; DARYANI, A. Neospora Caninum Infection in Aborting Bovines and Lost Fetuses: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PloS One**, v. 17, n. 5, p. e0268903, 2022.

NISHIKAWA, Y.; SHIMODA, N.; FEREIG, R. M.; MORITAKA, T.; UMEDA, K.; NISHIMURA, M.; IHARA, F.; KOBAYASHI, K.; HIMORI, Y.; SUZUKI, Y.; FURUOKA, H. Neospora Caninum Dense Granule Protein 7 Regulates the Pathogenesis of Neosporosis by Modulating Host Immune Response. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 18, p. e01350-18, 15 set. 2018.

PARKER, J. M.; GUO, D.; HODGES, R. S. New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X-Ray-Derived Accessible Sites. **Biochemistry**, v. 25, n. 19, p. 5425–5432, 23 set. 1986.

PEPPER, M.; DZIERZINSKI, F.; WILSON, E.; TAIT, E.; FANG, Q.; YAROVINSKY, F.; LAUFER, T. M.; ROOS, D.; HUNTER, C. A. Plasmacytoid Dendritic Cells Are Activated by Toxoplasma Gondii to Present Antigen and Produce Cytokines. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 180, n. 9, p. 6229–6236, 1 maio 2008.

PEREIRA, H. S.; E ALMEIDA, L. T.; FERNANDES, V.; SENRA, R. L.; FONTES, P. P.; BITTAR, E. R.; RIBON, A. de O. B.; ROTTA, P. P.; MENEZES-SOUZA, D.; BITTAR, J. F. F.; MENDES, T. A. de O. Chimeric Protein Designed by Genome-Scale Immunoinformatics Enhances Serodiagnosis of Bovine Neosporosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 7, p. e01343-19, 24 jun. 2020.

PEREIRA, L. M.; BARONI, L.; YATSUDA, A. P. A Transgenic Neospora Caninum Strain Based on Mutations of the Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase Gene. **Experimental Parasitology**, v. 138, p. 40–47, mar. 2014.

PEREIRA, L. M.; YATSUDA, A. P. The Chloramphenicol Acetyltransferase Vector as a Tool for Stable Tagging of Neospora Caninum. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 196, n. 2, p. 75–81, set. 2014.

PFEFFERKORN, E. R. Interferon Gamma Blocks the Growth of Toxoplasma Gondii in Human Fibroblasts by Inducing the Host Cells to Degrade Tryptophan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 3, p. 908–912, fev. 1984.

PINHEIRO, A. F.; BORSUK, S.; BERNE, M. E. A.; PINTO, L. da S.; ANDREOTTI, R.; ROOS, T.; ROLLOF, B. C.; LEITE, F. P. L. Expression of Neospora Caninum NcSRS2 Surface Protein in Pichia Pastoris and Its Application for Serodiagnosis of Neospora Infection. **Pathogens and Global Health**, v. 107, n. 3, p. 116–121, abr. 2013.

PITTMAN, K. J.; ALIOTA, M. T.; KNOLL, L. J. Dual Transcriptional Profiling of Mice and *Toxoplasma Gondii* during Acute and Chronic Infection. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 806, 20 set. 2014.

REICHEL, M. P.; ALEJANDRA AYANEGUI-ALCÉRRECA, M.; GONDIM, L. F. P.; ELLIS, J. T. What Is the Global Economic Impact of *Neospora Caninum* in Cattle - the Billion Dollar Question. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 133–142, fev. 2013.

REIS E SOUSA, C.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; JANKOVIC, D.; CHAREST, H.; GERMAIN, R. N.; SHER, A. In Vivo Microbial Stimulation Induces Rapid CD40 Ligand-Independent Production of Interleukin 12 by Dendritic Cells and Their Redistribution to T Cell Areas. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 11, p. 1819–1829, 1 dez. 1997.

RIBEIRO, V. da S.; GONZAGA, H. T.; NUNES, D. da S.; GOULART, L. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Neurocysticercosis Serodiagnosis: Mimotope-Based Synthetic Peptide as Potential Biomarker. **Parasitology Research**, v. 118, n. 5, p. 1657–1660, maio 2019.

ROBBEN, P. M.; MORDUE, D. G.; TRUSCOTT, S. M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; SIBLEY, L. D. Production of IL-12 by Macrophages Infected with *Toxoplasma Gondii* Depends on the Parasite Genotype. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 172, n. 6, p. 3686–3694, 15 mar. 2004.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.-L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264–296, abr. 2012.

ROSENBERG, A.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma Gondii* Secreted Effectors Co-Opt Host Repressor Complexes to Inhibit Necroptosis. **Cell Host & Microbe**, v. 29, n. 7, p. 1186- 1198.e8, 14 jul. 2021.

SAEIJ, J. P. J.; COLLIER, S.; BOYLE, J. P.; JEROME, M. E.; WHITE, M. W.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma* Co-opts Host Gene Expression by Injection of a Polymorphic Kinase Homologue. **Nature**, v. 445, n. 7125, p. 324–327, 18 jan. 2007.

SANGARÉ, L. O.; YANG, N.; KONSTANTINOU, E. K.; LU, D.; MUKHOPADHYAY, D.; YOUNG, L. H.; SAEIJ, J. P. J. *Toxoplasma* GRA15 Activates the NF- κ B Pathway through Interactions with TNF Receptor-Associated Factors. **mBio**, v. 10, n. 4, p. e00808-19, 16 jul. 2019.

SASAI, M.; PRADIPTA, A.; YAMAMOTO, M. Host Immune Responses to *Toxoplasma Gondii*. **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 113–119, 10 mar. 2018.

SCANGA, C. A.; ALIBERTI, J.; JANKOVIC, D.; TILLOY, F.; BENNOUNA, S.; DENKERS, E. Y.; MEDZHITOV, R.; SHER, A. Cutting Edge: MyD88 Is Required for Resistance to *Toxoplasma Gondii* Infection and Regulates Parasite-Induced IL-12 Production by Dendritic Cells. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 168, n. 12, p. 5997–6001, 15 jun. 2002.

SCHWARTZMAN, J.; MAFFIA, A. Congenital Toxoplasmosis. **The Journal of Pediatrics**, v. 33, n. 1, p. 66–73, jul. 1948.

SHEN, B.; BROWN, K. M.; LEE, T. D.; SIBLEY, L. D. Efficient Gene Disruption in Diverse Strains of *Toxoplasma Gondii* Using CRISPR/CAS9. **mBio**, v. 5, n. 3, p. e01114- 01114, 13 maio 2014.

SIDIK, S. M.; HACKETT, C. G.; TRAN, F.; WESTWOOD, N. J.; LOURIDO, S. Efficient Genome Engineering of *Toxoplasma gondii* Using CRISPR/Cas9. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e100450, 27 jun. 2014.

SIDIK, S. M.; HUET, D.; GANESAN, S. M.; HUYNH, M.-H.; WANG, T.; NASAMU, A. S.; THIRU, P.; SAEIJ, J. P. J.; CARRUTHERS, V. B.; NILES, J. C.; LOURIDO, S. A Genome-Wide CRISPR Screen in *Toxoplasma* Identifies Essential Apicomplexan Genes. **Cell**, v. 166, n. 6, p. 1423- 1435.e12, 8 set. 2016.

SINGH, U.; BREWER, J. L.; BOOTHROYD, J. C. Genetic Analysis of Tachyzoite to Bradyzoite Differentiation Mutants in *Toxoplasma Gondii* Reveals a Hierarchy of Gene Induction. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 721–733, maio 2002.

SOETE, M.; HETTMAN, C.; SOLDATI, D. The Importance of Reverse Genetics in Determining Gene Function in Apicomplexan Parasites. **Parasitology**, v. 118 Suppl, p. S53-61, 1999.

SOHN, C. S.; CHENG, T. T.; DRUMMOND, M. L.; PENG, E. D.; VERMONT, S. J.; XIA, D.; CHENG, S. J.; WASTLING, J. M.; BRADLEY, P. J. Identification of Novel Proteins in *Neospora Caninum* Using an Organelle Purification and Monoclonal Antibody Approach. **PloS One**, v. 6, n. 4, p. e18383, 4 abr. 2011.

SONG, X.; LIN, M.; LI, M.; YANG, X.; LIU, J.; LIU, Q. *Toxoplasma Gondii* Metacaspase 2 Is an Important Factor That Influences Bradyzoite Formation in the Pru Strain. **Parasitology Research**, v. 119, n. 7, p. 2287–2298, jul. 2020.

STAHL, H. D.; CREWETHER, P. E.; ANDERS, R. F.; BROWN, G. V.; COPPEL, R. L.; BIANCO, A. E.; MITCHELL, G. F.; KEMP, D. J. Interspersed Blocks of Repetitive and Charged Amino Acids in a Dominant Immunogen of *Plasmodium Falciparum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 2, p. 543–547, jan. 1985.

SZERLONG, H.; HINATA, K.; VISWANATHAN, R.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; CAIRNS, B. R. The HSA Domain Binds Nuclear Actin-Related Proteins to Regulate Chromatin-Remodeling ATPases. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 15, n. 5, p. 469–476, maio 2008.

TSIATSIANI, L.; VAN BREUSEGEM, F.; GALLOIS, P.; ZAVIALOV, A.; LAM, E.; BOZHKO, P. V. Metacaspases. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, n. 8, p. 1279–1288, ago. 2011.

UREN, A. G.; O'ROURKE, K.; ARAVIND, L. A.; PISABARRO, M. T.; SESHAGIRI, S.; KOONIN, E. V.; DIXIT, V. M. Identification of Paracaspases and Metacaspases: Two Ancient Families of Caspase-like Proteins, One of Which

Plays a Key Role in MALT Lymphoma. **Molecular Cell**, v. 6, n. 4, p. 961–967, out. 2000.

VISWANATHAN, S.; WILLIAMS, M. E.; BLOSS, E. B.; STASEVICH, T. J.; SPEER, C. M.; NERN, A.; PFEIFFER, B. D.; HOOKS, B. M.; LI, W.-P.; ENGLISH, B. P.; TIAN, T.; HENRY, G. L.; MACKLIN, J. J.; PATEL, R.; GERFEN, C. R.; ZHUANG, X.; WANG, Y.; RUBIN, G. M.; LOOGER, L. L. High-Performance Probes for Light and Electron Microscopy. **Nature Methods**, v. 12, n. 6, p. 568–576, jun. 2015.

WALKER, J. R.; CORPINA, R. A.; GOLDBERG, J. Structure of the Ku Heterodimer Bound to DNA and Its Implications for Double-Strand Break Repair. **Nature**, v. 412, n. 6847, p. 607–614, 9 ago. 2001.

WANG, C.; YANG, C.; LIU, J.; LIU, Q. NcPuf1 Is a Key Virulence Factor in Neospora Caninum. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 12, p. E1019, 2 dez. 2020.

WANG, F.; WANG, X.; SONG, X.; MA, L.; YANG, J.; LIU, Q.; LIU, J. Function of Neospora Caninum Dense Granule Protein 7 in Innate Immunity in Mice. **Parasitology Research**, v. 120, n. 1, p. 197–207, jan. 2021.

WILSON, D. C.; MATTHEWS, S.; YAP, G. S. IL-12 Signaling Drives CD8+ T Cell IFN-Gamma Production and Differentiation of KLRG1+ Effector Subpopulations during Toxoplasma Gondii Infection. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 180, n. 9, p. 5935–5945, 1 maio 2008.

WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B. HUMAN TOXOPLASMOSIS: OCCURRENCE IN INFANTS AS AN ENCEPHALOMYELITIS VERIFICATION BY TRANSMISSION TO ANIMALS. **Science (New York, N.Y.)**, v. 89, n. 2306, p. 226–227, 10 mar. 1939.

WOODMAN, J. P.; DIMIER, I. H.; BOUT, D. T. Human Endothelial Cells Are Activated by IFN-Gamma to Inhibit Toxoplasma Gondii Replication. Inhibition Is Due to a Different Mechanism from That Existing in Mouse Macrophages and Human Fibroblasts. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 147, n. 6, p. 2019–2023, 15 set. 1991.

YAMAMOTO, M.; JIN, C.; HATA, T.; YASUMIZU, Y.; ZHANG, Y.; HONG, D.; MAEDA, T.; MIYO, M.; HIRAKI, M.; SUZUKI, Y.; HINOHARA, K.; RAJABI, H.; KUFU, D. MUC1-C Integrates Chromatin Remodeling and PARP1 Activity in the DNA Damage Response of Triple-Negative Breast Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 79, n. 8, p. 2031–2041, 15 abr. 2019.

YANG, C.; LIU, J.; MA, L.; ZHANG, X.; ZHANG, X.; ZHOU, B.; ZHU, X.; LIU, Q. NcGRA17 Is an Important Regulator of Parasitophorous Vacuole Morphology and Pathogenicity of Neospora Caninum. **Veterinary Parasitology**, v. 264, p. 26–34, 15 dez. 2018.

YBAÑEZ, R. H. D.; TERKAWI, M. A.; KAMEYAMA, K.; XUAN, X.; NISHIKAWA, Y. Identification of a Highly Antigenic Region of Subtilisin-like Serine Protease 1

for Serodiagnosis of Neospora Caninum Infection. **Clinical and vaccine immunology: CVI**, v. 20, n. 10, p. 1617–1622, out. 2013.

ZHANG, G.; HUANG, X.; BOLDBAATAR, D.; BATTUR, B.; BATTSETSEG, B.; ZHANG, H.; YU, L.; LI, Y.; LUO, Y.; CAO, S.; GOO, Y.-K.; YAMAGISHI, J.; ZHOU, J.; ZHANG, S.; SUZUKI, H.; IGARASHI, I.; MIKAMI, T.; NISHIKAWA, Y.; XUAN, X. Construction of Neospora Caninum Stably Expressing TgSAG1 and Evaluation of Its Protective Effects against Toxoplasma Gondii Infection in Mice. **Vaccine**, v. 28, n. 45, p. 7243–7247, 21 out. 2010.

ANEXO

Efficient Gene Knockout and Knockdown Systems in Neospora caninum Enable Rapid Discovery and Functional Assessment of Novel Proteins
Tiago WP Mineo, Jessica H Chern, Amara C Thind, Caroline M Mota, Santhosh M Nadipuram, Juan A Torres, Peter J Bradley
mSphere, 2022, 7:e0089621. <https://doi.org/10.1128/msphere.00896-21>



Efficient Gene Knockout and Knockdown Systems in *Neospora caninum* Enable Rapid Discovery and Functional Assessment of Novel Proteins

 **Tiago W. P. Mineo,^{a,b} Jessica H. Chern,^a Amara C. Thind,^{a,c} Caroline M. Mota,^{a,b} Santhosh M. Nadipuram,^a Juan A. Torres,^a Peter J. Bradley^{a,c}**

^aDepartment of Microbiology, Immunology and Molecular Genetics, University of California, Los Angeles, Los Angeles, California, USA

^bLaboratory of Immunoparasitology “Dr. Mário Endsfieldz Camargo,” Institute of Biomedical Sciences, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

^cMolecular Biology Institute, University of California, Los Angeles, Los Angeles, California, USA

ABSTRACT The development of molecular genetics has greatly enhanced the study of the biology and pathology associated with parasites of the phylum Apicomplexa. While the molecular tools are highly developed for the apicomplexan *Toxoplasma gondii*, the closely related parasite *Neospora caninum* lacks efficient tools for genetic manipulation. To enable efficient homologous recombination in *N. caninum*, we targeted the Ku heterodimer DNA repair mechanism in the genomic reference strain, Nc-Liverpool (NcLiv), and show that deletion of *Ku80* results in a destabilization and loss of its partner Ku70. Disruption of *Ku80* generated parasites in which genes are efficiently epitope tagged and only short homology regions are required for gene knockouts. We used this improved strain to target novel nonessential genes encoding dense granule proteins that are unique to *N. caninum* or conserved in *T. gondii*. To expand the utility of this strain for essential genes, we developed the auxin-inducible degron system for *N. caninum* using parasite-specific promoters. As a proof of concept, we knocked down a novel nuclear factor in both *N. caninum* and *T. gondii* and showed that it is essential for survival of both parasites. Together, these efficient knockout and knockdown technologies will enable the field to unravel specific gene functions in *N. caninum*, which is likely to aid in the identification of targets responsible for the phenotypic differences observed between these two closely related apicomplexan parasites.

IMPORTANCE *Neospora caninum* is a parasite with veterinary relevance, inducing severe disease in dogs and reproductive disorders in ruminants, especially cattle, leading to major losses. The close phylogenetic relationship to *Toxoplasma gondii* and the lack of pathogenicity in humans drives an interest of the scientific community toward using *N. caninum* as a model to study the pathogenicity of *T. gondii*. To enable this comparison, it is important to develop efficient molecular tools for *N. caninum*, to gain accuracy and save time in genetic manipulation protocols. Here, we have developed base strains and protocols using the genomic reference strain of *N. caninum* to enable efficient knockout and knockdown assays in this model. We demonstrate that these tools are effective in targeting known and previously unexplored genes. Thus, these tools will greatly improve the study of this protozoan, as well as enhance its ability to serve as a model to understand other apicomplexan parasites.

KEYWORDS *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, Ku80, CRISPR/Cas9, dense granule, auxin-inducible degron

N*eospora caninum* is a coccidian that belongs to a diverse group of parasitic protozoans of the phylum Apicomplexa. *N. caninum* is closely related to *Toxoplasma gondii*, which is perhaps the best studied member of the phylum and an important human pathogen of

Editor Ira J. Blader, University at Buffalo

Copyright © 2022 Mineo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Peter J. Bradley, pbradley@ucla.edu, or Tiago W. P. Mineo, tiago.mineo@ufu.br.

The authors declare no conflict of interest.

Received 31 October 2021

Accepted 21 December 2021

Published 12 January 2022

immunocompromised patients and congenitally infected neonates. While *T. gondii* infects a wide range of warm-blooded vertebrates, including an estimated one-third of the world's human population (1), *N. caninum* has a narrower host range, primarily targeting ruminants and dogs (2). It is one of the leading causes of bovine abortions in the world, inducing significant economic losses to cattle raising (3).

One strategy routinely used to gain a better understanding of the biology of these parasites is based on the development of a robust set of molecular approaches that enable reliable analyses of specific genetic targets. For functional analyses, reverse genetics methods were made possible by the advent of transfection protocols in a number of model apicomplexans (4, 5). This advance led to the development of an array of genetic tools for detailed genetic manipulation of these parasites. These tools are best developed and easiest to use in *T. gondii*, which includes an assortment of promoters, selectable markers, fluorescent proteins, genome editing strategies, and knock-out and conditional knockdown approaches (6).

For *N. caninum*, however, this toolkit lags substantially behind its more prominent, closely-related parasite, *T. gondii*. Although transfection of *Neospora* has been available for decades, most genetic approaches took advantage of vectors developed specifically for *T. gondii* (7, 8). While those tools are useful for the stable insertion of heterologous genes of interest (GOI) (9–11), further development of the model is needed. For example, while a background strain with a single point mutation on the hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene (*Nc1Δhxgprt*) has been developed as a selectable marker (12–14), it was generated by chemical mutagenesis, which likely generated many mutations and is only available in the NC-1 strain, not the sequenced reference strain NcLiv.

HXGPRT has been used successfully as a selectable marker for stable transformation in *T. gondii* for over 20 years, due to its safety and versatility conferred by the positive or negative selection with mycophenolic acid/xanthine (Mpa/X) or 6-thioxanthine (6TX), respectively (15). Other available selectable markers include *chloramphenicol acetyltransferase* (*CAT*) and a mutated version of *dihydrofolate reductase-thymidylate synthase* (*DHFR*) driven by either *Toxoplasma* or endogenous *Neospora* promoters. These markers have been effectively used for gene insertions and endogenous tagging, based on selection strategies using resistance to chloramphenicol and pyrimethamine, respectively (16, 17).

The advent of genome editing tools based on clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated gene 9 (CRISPR/Cas9) system has dramatically changed each system in which it has been developed. The CRISPR/Cas9 system was adapted for *T. gondii* (18, 19) and has contributed to the field by promoting fast and precise targeted gene disruption, endogenous epitope tagging, and site-specific insertion of selectable markers. Without further adaptation, plasmids with CRISPR/Cas9 components used in *T. gondii* were satisfactorily used to disrupt GFP in *N. caninum* tachyzoites stably expressing the fluorescent marker, as well as disrupt the *NcGRA7* gene by insertion of a selectable marker (20). Since then, pU6 plasmids—adapted or not with *N. caninum* promoters—have been employed for endogenous epitope tagging and gene disruption, especially of genes encoding dense granule proteins (21–25). Those strategies typically rely on large homology flanks (over 800 bp) for homology-directed repair or disruption by insertion of selectable markers, which is a setback compared with the stage of development of the CRISPR/Cas9 system found in the *Toxoplasma* model.

The key difference in *Toxoplasma* is the combination of an efficient CRISPR/Cas9 system in the background of a knockout of the *Ku80* gene, which enables highly efficient recombination (26, 27). The Ku heterodimer is conserved in eukaryotes and is formed by two subunits, Ku70 and Ku80, that maintain genomic integrity through binding to DNA double-strand breaks, making repairs by the non-homologous end joining (NHEJ) pathway (28). In its absence, random integration is greatly diminished, which allows for a more precise manipulation of the targeted loci through homologous recombination. In this work, we aimed to further improve the molecular toolbox of the *Neospora* model system. To do this, we disrupted *Ku80* in the NcLiv strain and subsequently disrupted the *HXGPRT* selectable

marker used for *Ku80* disruption, thereby recycling this marker for downstream selections. We examined the effect of the absence of Ku80 on its partner Ku70 and demonstrated that CRISPR/Cas9 based endogenous gene tagging and knockouts become efficient similar to that observed in *T. gondii*. We additionally modified this strain for conditional knockouts by adapting the auxin-inducible degron system. We demonstrate the utility of these strains by disrupting two secreted GRA proteins and conditionally disrupting a novel nuclear protein. Thus, these new tools dramatically improve the molecular toolkit of *N. caninum*.

RESULTS

Disruption of *HXGPRT* in the NcLiv strain using CRISPR/Cas9. To aid in the genetic manipulation of *N. caninum*, we first sought to disrupt the selectable marker *HXGPRT* using CRISPR/Cas9 (Fig. 1A). To do this, we generated sequences encoding a guide RNA (gRNA) against *Neospora*'s *HXGPRT* (*NcHXGPRT*, NCLIV_038170) in the pU6 universal plasmid and transfected it into wild-type NcLiv parasites (18, 19). Knockouts of *NcHXGPRT* were negatively selected with 6TX and cloned by limiting dilution, and a clone was chosen that failed to grow in positive selection (Mpa/X). Sequencing of the coding region showed a single nucleotide deletion at the gRNA site within the *HXGPRT* locus (Fig. 1A), and this strain was designated NcLiv Δ *hxgprt*.

Epitope tagging and disruption of Ku80 in *N. caninum*. To improve the efficiency of homologous recombination in the NcLiv Δ *hxgprt* strain, we then targeted the *Ku80* gene (NCLIV_056045), which has been shown to dramatically improve recombination in *T. gondii* (26, 27). We first used CRISPR/Cas9 to add a 3xHA epitope tag at the C-terminus of Ku80 as well as the selectable marker *DHFR*, which resulted in parasites with nuclear staining as expected (NcLivKu80^{3xHA}; Fig. 1B).

To disrupt the *Ku80* gene in NcLivKu80^{3xHA} background, we created a gRNA against the beta-barrel domain of Ku80 and a homology directed repair template that consisted of the *Ku80* 5' and 3' flanking regions, cloned upstream and downstream of a *Toxoplasma* *HXGPRT* selection cassette (Fig. 1C). These were transfected into the tagged parasites and selected, and clonal isolates were screened for the absence of Ku80 staining. One isolate was selected and the correct replacement of *Ku80* with *HXGPRT* was verified by PCR (Fig. 1D). To improve the utility of this NcLiv Δ *ku80* (+*TgHXGPRT*) strain for downstream analyses, we used a similar strategy of a gRNA and homologous recombination to delete the *T. gondii* *HXGPRT* selectable marker from the *Ku80* locus using negative selection (6TX; Fig. 1E). The deletion of *TgHXGPRT* was confirmed by PCR and the strain lacking both *Ku80* and *HXGPRT* was designated NcLiv Δ *h Δ k* (Fig. 1F).

Ku70 is destabilized in NcLiv Δ *h Δ k* parasites. Ku80 works in conjunction with its partner protein Ku70 to facilitate nonhomologous end joining (28). To assess whether disruption of Ku80 had an effect on its partner, we epitope tagged Ku70 in both NcLiv Δ *hxgprt* and NcLiv Δ *h Δ k* strain parasites (Fig. 2A). Immunofluorescence assay (IFA) of the NcLiv Δ *hxgprt* strain containing wild-type Ku80 showed a nuclear localization for Ku70, as expected (Fig. 2B). However, in NcLiv Δ *h Δ k* strain parasites, the staining of Ku70 was dramatically decreased (Fig. 2C) and in many parasites was undetectable (not shown). The impact on Ku70 was confirmed by Western blot analysis, which showed a nearly complete loss of detectable signal (Fig. 2D). These data indicate that disruption of *Ku80* results in the concomitant destabilization and degradation of Ku70.

Highly efficient gene tagging in Δ *ku80* parasites identifies novel secreted and nuclear factors. Disruption of *Ku80* in *T. gondii* results in a dramatic increase in the efficiency of CRISPR/Cas9 epitope tagging due to increased homologous recombination (26). To determine if this was also the case in *N. caninum*, we compared the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated epitope tagging of endogenous genes in strains with and without the protein (Fig. 3). We selected three genes for epitope tagging; the *Neospora* orthologue of the *T. gondii* secreted protein GRA48 (NcGRA48, NCLIV_069360), a novel *Neospora*-specific protein that contains a signal peptide and a downstream series of tandem repeats (NCLIV_066730; Fig. S1 in the supplemental material), and a novel protein (NCLIV_049870) whose orthologue in *T. gondii* has a strongly negative fitness score in the genome-wide CRISPR/Cas9 screen (TGGT1_235420, -4.8), suggesting it is either important for fitness or essential (Fig. 3A). For epitope tagging, the

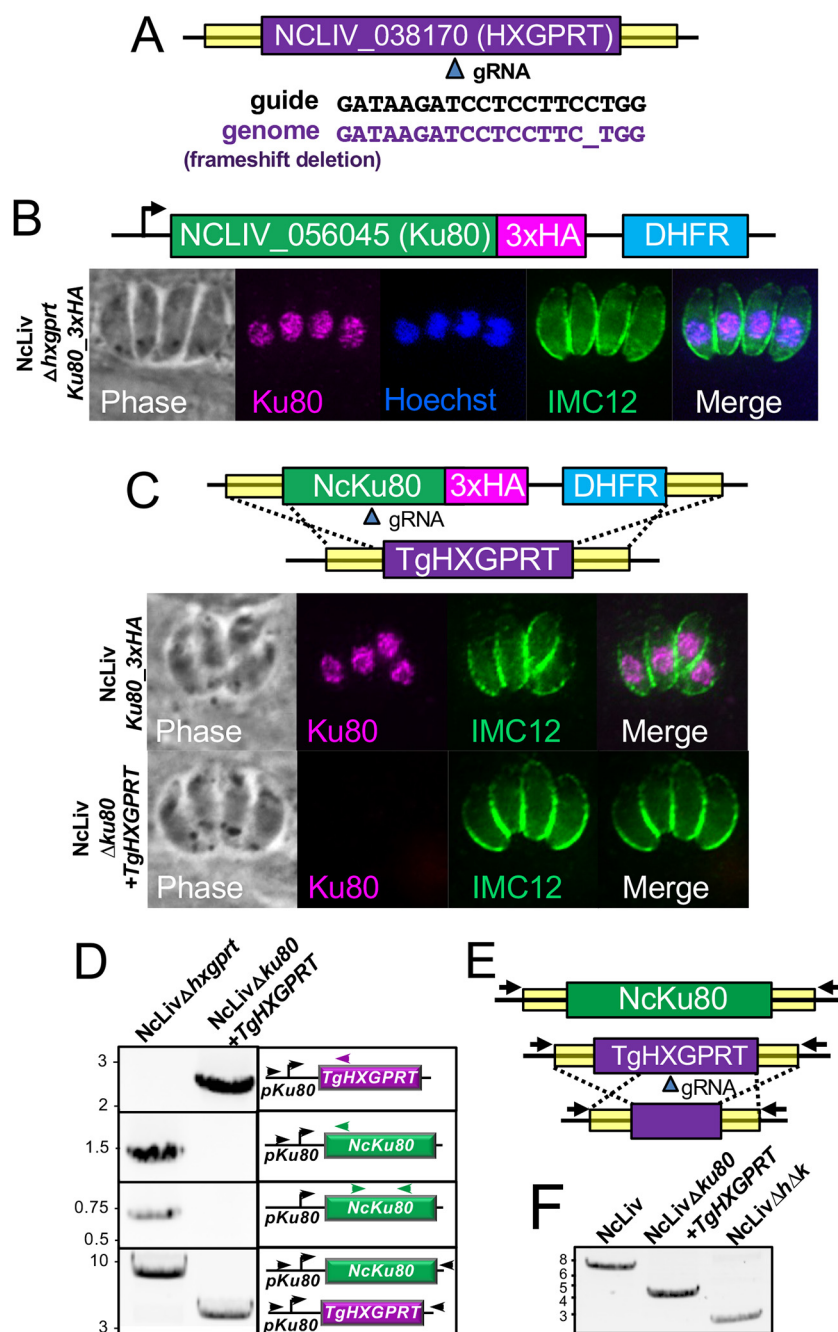


FIG 1 Disruption of *HXGPRT* and *Ku80* in NcLiv strain parasites. (A) Diagram showing CRISPR/Cas9 targeting of *HXGPRT* and resulting deletion of a single nucleotide rendering parasites sensitive to Mpa/X. (B) Schematic and IFA of 3xHA endogenous gene tagging of *Ku80*. *Ku80* localizes to the nucleus as assessed by Hoechst costain, and IMC12 is used to mark the periphery of the parasites. (C) Disruption of tagged *Ku80* using CRISPR/Cas9 and a homology template with the selectable marker *HXGPRT*. IFA shows the lack of staining in the NcLiv Δ ku80 (+*HXGPRT*) strain. (D) PCR verification of the *Ku80* knockout shows the selectable marker is in the *Ku80* locus (primers P47/P48) and the coding region is eliminated in the knockout (primers P47/P49; P50/P51). (E) Diagram and (F) PCR verification (primers P47/P52) showing the elimination of *HXGPRT* using negative selection with 6TX to generate parasites lacking both *Ku80* and *HXGPRT* (denoted NcLiv Δ hΔk).

NcLiv Δ hxgprt and NcLiv Δ hΔk strains were transfected with a gRNA construct for each gene as well as a homology repair template with 40 bp regions of homology to the GOI as is frequently used in *T. gondii* (29). As expected, NcGRA48 tagging showed that this protein localizes to the parasitophorous vacuole (Fig. 3B). Similarly, NCLIV_066730 also localized to the vacuole, indicating that this is indeed a novel *Neospora*-specific GRA protein (Fig. 3C). To our

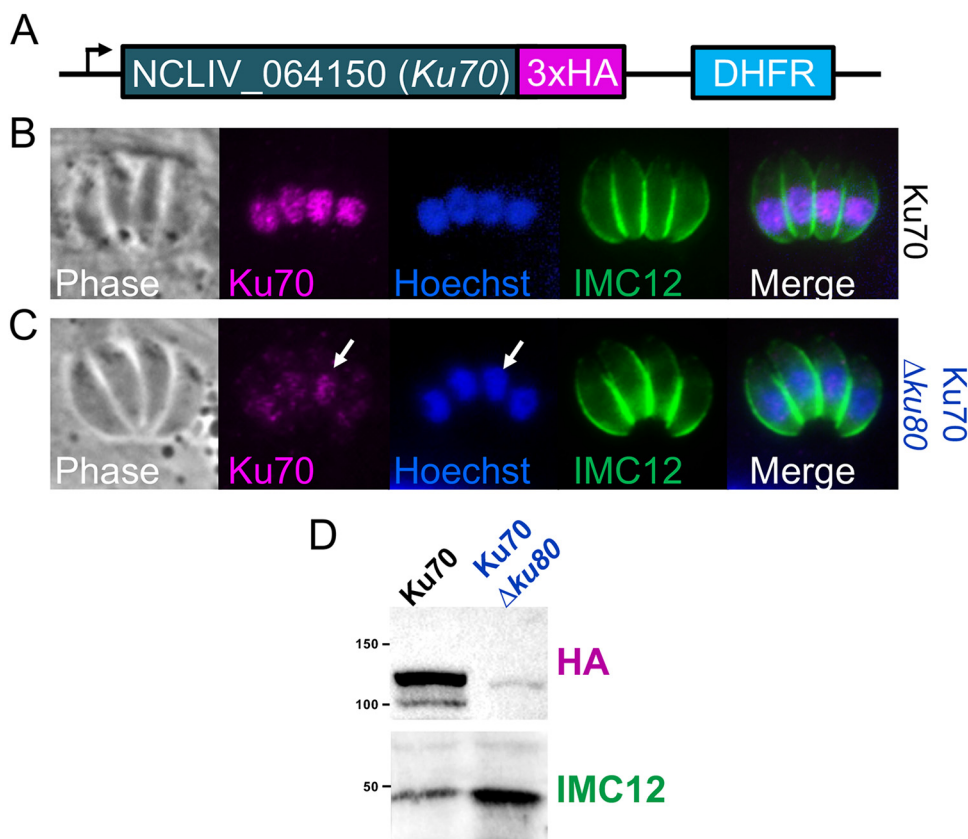


FIG 2 Disruption of Ku80 destabilizes its partner Ku70. (A) Diagram and IFA of Ku70 tagged with and without Ku80. Ku70 is nearly undetectable in the $\Delta ku80$ parasites. Parasites were costained with Hoechst to stain the nucleus and anti-IMC12 to label the periphery of the parasites. (B) Western blot showing that Ku70 is dramatically reduced in parasites lacking Ku80. IMC12 is used as a loading control.

knowledge, NCLIV_066730 is the first *Neospora*-specific GRA protein that has been identified, and thus we named it *Neospora*-specific GRA protein 1 (NSG1) to differentiate it from the other GRA proteins with orthologues in the family. In contrast, NCLIV_049870 localized to the nucleus of the parasite (Fig. 3D). In each case, the efficiency of tagging was dramatically increased from around 20% with Ku80 present to as much as 95% tagging efficiency in $\Delta ku80$ parasites (Fig. 3E). These data indicate that the NcLiv $\Delta h\Delta k$ strain has significantly improved recombination, verifies dense granule localization for NcGRA48, and identifies two completely new proteins in *N. caninum*.

Disruption of Ku80 results in efficient gene knockouts with minimal flanking regions. In *T. gondii*, disruption of *Ku80* enables highly efficient CRISPR/Cas9-mediated whole gene deletions using a CRISPR/Cas9 gRNA targeting the GOI plus a homology-directed repair template consisting of 40 bp flanking homology regions and a selectable marker (29, 30). In the absence of a *Ku80* deficient line in *Neospora*, gene knockouts have been shown to require substantial flanking regions of homology (21–23). Our knockout attempts using 40 bp homology flanks in a *Ku80* positive line appeared to generate disrupted genes by the insertion of the cassette containing the selectable marker inside the GOI's coding region, rather than the desired full gene deletions (not shown). To determine if precise deletions of genes could be obtained in NcLiv $\Delta h\Delta k$ parasites, we attempted to disrupt NcGRA48 and NSG1 in the epitope tagged strains using the identical approach with a *Toxoplasma* HXGPRT cassette as the selectable marker (Fig. 4). As predicted, we were able to efficiently disrupt both genes, as shown by a lack of staining for the epitope tag (Fig. 4A and B). We then PCR verified that the entire gene was properly deleted and replaced by HXGPRT (Fig. 4C to E). These data demonstrate that whole gene deletions can easily be obtained in NcLiv $\Delta h\Delta k$ parasites using minimal flanking regions, similar to that seen in *T. gondii* (29).

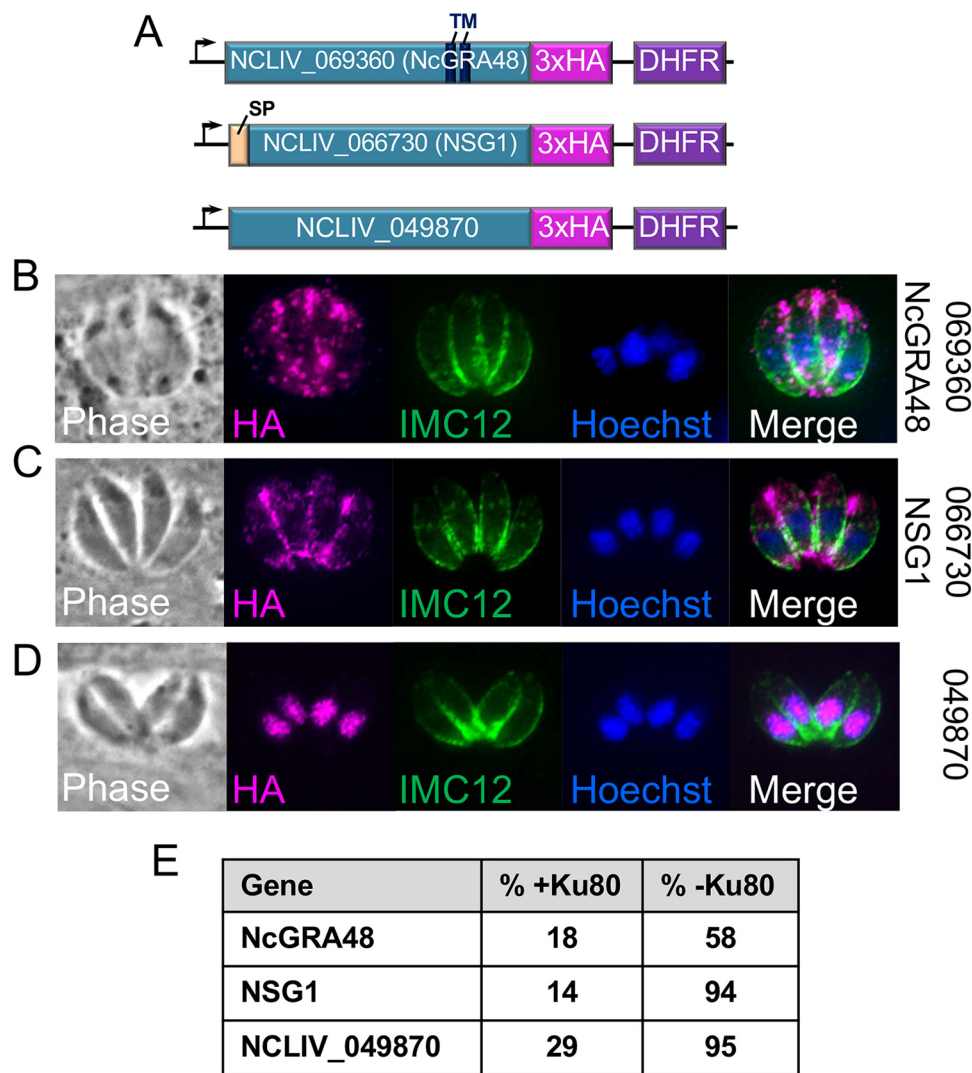


FIG 3 Efficient CRISPR/Cas9 mediated gene tagging in NcLivΔhΔk parasites identifies new secreted and nuclear proteins. (A) Gene model diagram of endogenous tagging of NCLIV_069360/NcGRA48, NCLIV_066730/NSG1, and NCLIV_049870. GRA48 contains two internal predicted transmembrane domains (TM), and NCLIV_066730 contains a predicted signal peptide (SP). Models are not drawn to scale. (B) IFA showing that NcGRA48 localizes to the vacuolar space surrounding the parasites, as expected for a dense granule protein. IMC12 is used to label the periphery of the parasites, and Hoechst staining is used to detect the parasite's nucleus. (C) IFA showing that 3xHA tagged NCLIV_066730 localizes to the vacuole. As NCLIV_066730 is *Neospora*-specific, it was named *Neospora*-specific GRA protein 1 (NSG1). (D) IFA showing that NCLIV_049870 localizes to the parasite's nucleus as shown by colocalization with Hoechst staining. (E) Diagram showing the frequency of endogenous gene tagging with and without *Ku80*. The frequency of gene tagging is dramatically increased in parasites lacking *Ku80*.

Development of the auxin-inducible degron system for *N. caninum*. We additionally wanted to utilize the NcLivΔhΔk parasites for the study of essential genes; thus, we modified the strain with an auxin-inducible degron (AID) system for conditional protein depletion (Fig. 5A) (31). To do this, we first attempted to express the Tir1 protein using a previously described *T. gondii* construct (31), but were unable to obtain stably expressing parasites (not shown). We thus replaced the promoter with the NcGRA7 promoter (Fig. 5B), which yielded stable expression of the protein localized to the cytoplasm of the parasite, as expected (Fig. 5C).

Knockdown of a novel nuclear protein identifies an essential nuclear factor in *N. caninum* and *T. gondii*. To validate the AID system in *N. caninum*, we targeted the nuclear protein NCLIV_049870 as we predicted it would be either very important or essential due to the fitness score of its *T. gondii* orthologue (TGGT1_235420). As a control, we first AID tagged TGGT1_235420 in Tir1-expressing *T. gondii* and found that TGGT1_235420^{AID} similarly

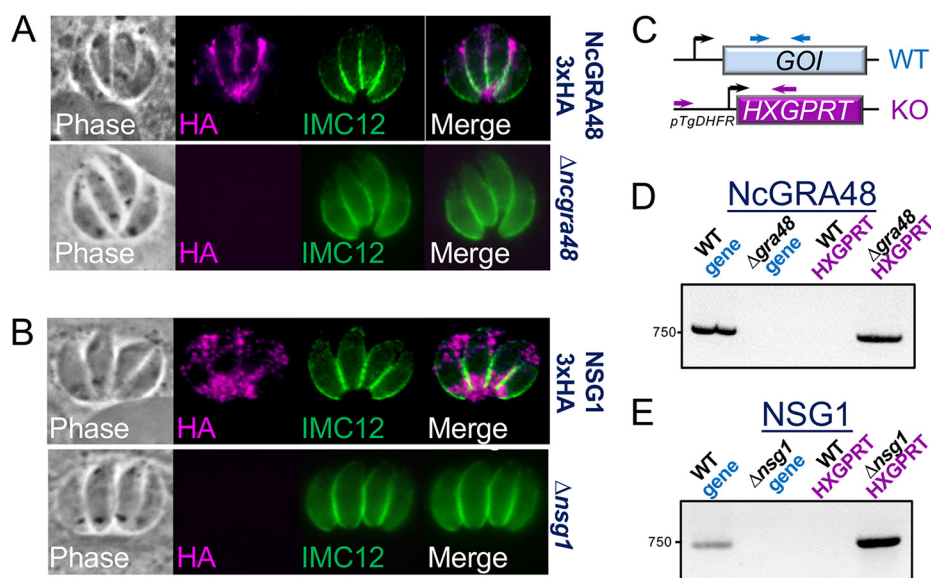


FIG 4 Deletion of *Ku80* enables efficient gene knockouts with minimal flanking regions for homology-directed repair. (A, B) IFA showing that deletion strategies eliminated the 3xHA-tag from NCLIV_069360/NcGRA48 and NCLIV_066730/NSG1 tagged strains. IMC12 is used to stain the periphery of the parasites. (C) Diagram showing strategy to PCR verify the gene of interest (GOI) deletions in NcLiv $\Delta h\Delta k$ parasites. (D, E) Agarose gel analyses of the gene knockouts showing integration of *HXGPRT* into the correct locus (NcGRA48: primers P53/P48; NSG1: primers P56/P48) as well as the absence of the GOI coding region in the knockout parasites (NcGRA48: primers P54/P55; NSG1: primers P57/P58).

localized to the nucleus (Fig. 6A and B). Knockdown of the protein with indoleacetic acid (IAA) resulted in a dramatic growth arrest of the parasites with the presence of mostly single parasites in a vacuole, some of which were in the process of endodyogeny (Fig. 6B). Many of the parasites also contained additional space within the vacuole. These parasites failed to grow further during elongated IAA treatment, as shown by plaque assays (Fig. 6C), demonstrating that TGGT1_235420 is essential in *T. gondii*. We then AID tagged NCLIV_049870 in Tir1-expressing *N. caninum* and found that the AID tagged protein also localized to the nucleus (Fig. 6D and E). IAA treatment of the NCLIV_049870^{AID} parasites resulted in an identical lethal growth arrest with swollen parasites and increased vacuolar space (Fig. 6E and F). This demonstrates the AID system is functional in *N. caninum* and shows that this newly identified nuclear factor is essential in both parasites.

DISCUSSION

The close similarity between *T. gondii* and *N. caninum* provides an excellent opportunity to explore the factors that are unique to each parasite and are likely to control parasite virulence, their dramatically different host range, and the ability to perform the sexual cycle in distinct definitive hosts. To improve genetic manipulation in *N. caninum*, we disrupted the NHEJ enzyme *Ku80* and found that we were able to obtain highly efficient CRISPR/Cas9-based gene tagging and knockouts. The frequency of tagging and ease of generating full gene knockouts (rather than just insertions) with a guide RNA plus a homology directed repair template are similar to that regularly observed in *T. gondii*. We additionally exploited the positive and negative selection of *HXGPRT* to generate parasites lacking this selectable marker (in addition to *Ku80*) for rapid tagging or knockout approaches. Together, these data suggest that recombination in NcLiv $\Delta h\Delta k$ parasites is similar to that seen in *T. gondii* and demonstrate the utility of this newly described strain for genetic manipulation in *N. caninum*.

We also demonstrated that loss of *Ku80* results in the dramatic reduction of its dimer partner *Ku70*, presumably via destabilization and degradation of the protein. In many $\Delta ku80$ parasites, *Ku70* is undetectable, suggesting the *Ku80* knockout is essentially a double knockout of the dimer (which requires both partners for function). This may be surprising as *Ku70* was previously reported to be essential in *T. gondii* (27). However, these studies were done with

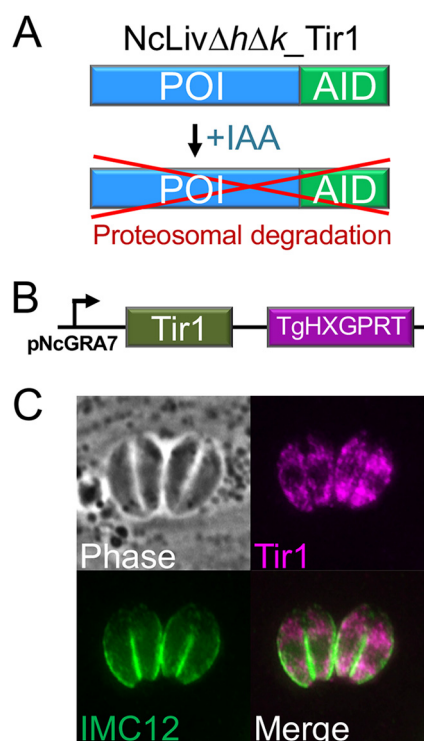


FIG 5 Stable expression of Tir1 in NcLiv $\Delta h\Delta k$ parasites. (A) Diagram of the AID system showing an auxin-inducible degron translational fusion is produced by endogenous gene tagging. Addition of indoleacetic acid (IAA) results in proteosomal degradation of the fusion protein. (B) Diagram of Tir1 driven from the *Neospora* GRA7 promoter, with *Toxoplasma* HXGPRT as a selectable marker. (C) IFA of NcLiv $\Delta h\Delta k$ parasites expressing Tir1^{FLAG}. As expected, Tir1 localizes to the cytoplasm of the parasites. IMC12 is used to show the periphery of the parasites.

early knockout tools that were just under development, and the *Ku70* fitness score (−0.75) in the genome-wide CRISPR/Cas9 screen suggests that it is dispensable (32). A similar degradation of a partner has been seen in the AC9/AC10/Erk7 complex, where knockdown of AC10 results in the complete loss of AC9 from this complex, which is essential for maintenance of the conoid and release of apical secretory organelles (30). This may indicate that *T. gondii* has a robust system for elimination of misfolded proteins within the parasite, and that ability seems preserved in *N. caninum*.

Two of the genes that we tagged for localization purposes were secreted proteins. As expected, the *Neospora* GRA48 localized to the vacuole, indicating it is a dense granule protein as is seen in *T. gondii*, in which it was described to be phosphorylated in the parasitophorous vacuole by another secreted *Toxoplasma* protein, the PV-resident kinase WNG1 (33). Although TgGRA48 has been localized and shown to be activated by another GRA, its function in tachyzoite development and/or host interaction is still unknown. Complementary studies for NcGRA48 may further elucidate the role of GRA48 in parasite biology and enable a comparison between the orthologues of the protein.

The other predicted secreted protein was also demonstrated to be a dense granule protein. We initially selected NSG1 as a target because it was uncharacterized and is *Neospora*-specific, without any known orthologues within the Sarcocystidae family of Apicomplexa. *Neospora* appears to lack a number of the GRAs present in *T. gondii* that are known to modulate host functions, including GRA15, GRA24, TEEGR, TgIST, and TgNSM (34–39). Those *Toxoplasma* GRAs that are missing in *Neospora* may be important molecules controlling parasite virulence or host range. However, NSG1 is the first *Neospora* GRA that is absent in *T. gondii*, suggesting that this effector protein may modulate *Neospora*-specific activities in the host or carry out some other function in the *Neospora* parasite vacuole.

The mature NSG1 protein is largely composed of tandem repeats, which are also present in several secreted *Toxoplasma* proteins (e.g., GRA16, MAG2, ROP1, TLN1). While

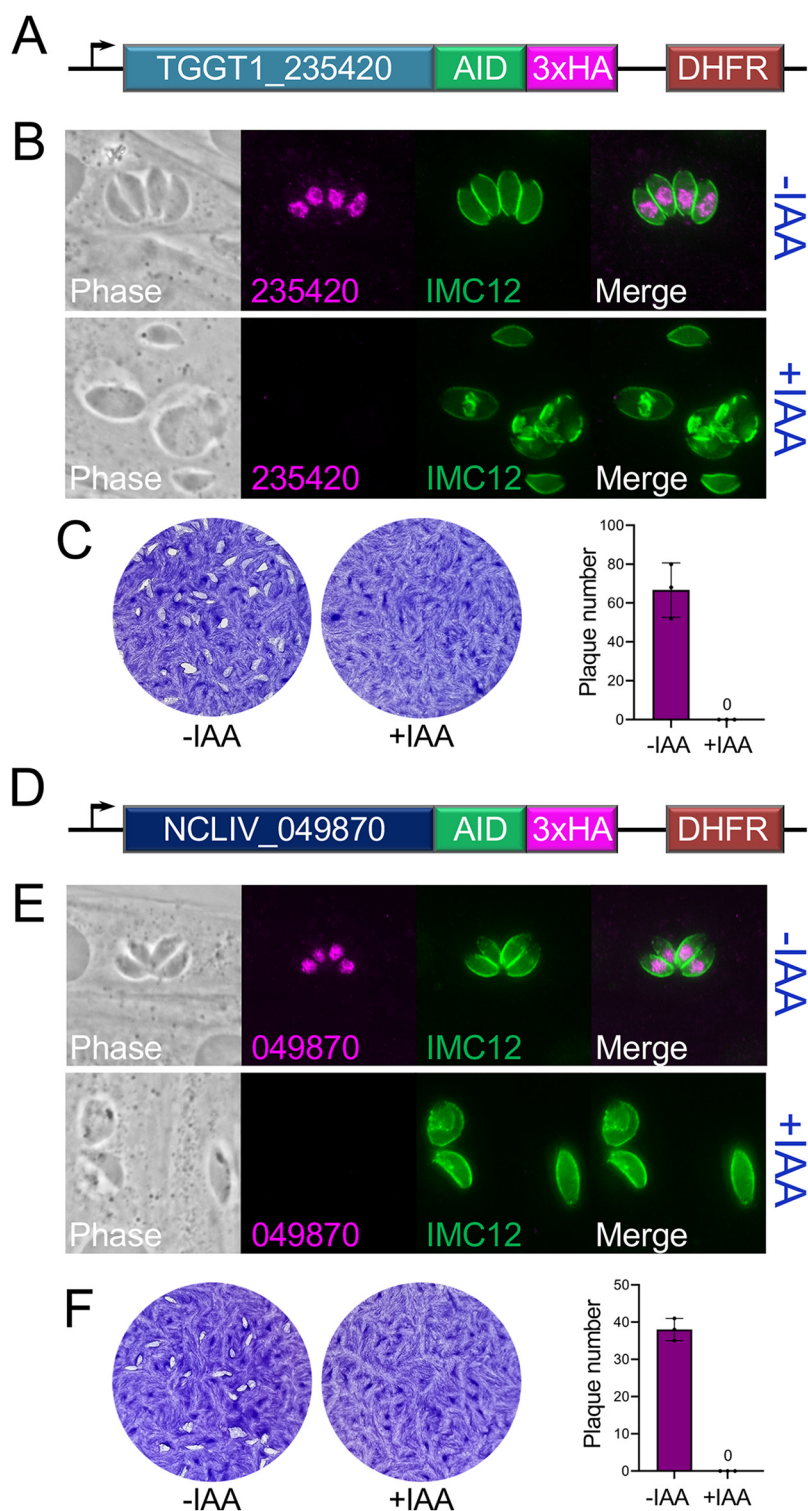


FIG 6 Conditional knockdown of a novel nuclear protein demonstrates essentiality in *T. gondii* and *N. caninum*. (A) Diagram of endogenous AID-tagged TGGT1_235420 in Tir1-expressing *T. gondii*. Tagging includes a 3xHA tag for detection and a DHFR cassette for selection. (B) IFA showing that 24-h addition of IAA results in loss of the nuclear HA signal and growth arrest of the parasites. Multiple vacuoles are shown +IAA to highlight that the parasites arrest at a single parasite per vacuole with some in the process of replication. Expanded vacuoles are also observed. (C) Plaque assays and quantification of plaque numbers showing that no plaques are formed upon TGGT1_235420 knockdown, confirming the protein is essential in *T. gondii*. (D) Diagram of endogenous AID-tagged NCLIV_049870 in Tir1-expressing *N. caninum*. (E) IFA showing that addition of IAA results in a similar growth arrest of the parasites with swollen vacuoles. (F) Plaque assays and quantification of plaque numbers showing that NCLIV_049870 is essential in *N. caninum*.

these repeats differ in their sequences and are typically of unknown function, they have been hypothesized to have a function in host cell invasion, immune evasion, and ultimately virulence (40–42). It will be particularly interesting to assess whether there is a strong immune response to NSG1, as this may indicate a role on immunity. In addition, NSG1 may serve as a unique antigen for diagnostic purposes, which have largely centered on the detection of surface antigens or secreted proteins present in both species that have diverged substantially to generate parasite-specific responses (43–45). In that sense, it is remarkable that NSG1 is predicted to have linear B cell epitopes throughout its whole sequence, with high scores for hydrophilicity, accessibility, and flexibility exactly in the region where one of the sets of the tandem repeats are concentrated (Fig. S1B). These features have been well characterized for that purpose in other protozoan parasites such as *Leishmania* and *T. cruzi* (46, 47).

We additionally modified the NcLiv Δ h Δ k strain with the AID system for the rapid analysis of essential genes. We initially expressed Tir1 using the *T. gondii* construct that is driven from the tubulin promoter, but the parasites had variable levels of expression, even within parasites in a single vacuole. This variable expression from *Toxoplasma* promoters in *Neospora* has been observed previously in the study of rhoptry proteins (9), and was resolved by using the *Neospora* GRA7 promoter. The variable expression suggests that it may be best practice to use *Neospora* promoters whenever possible, although *Toxoplasma* promoters have been shown to be successful for many uses (9, 10, 20). The AID system in the Δ ku80 background thus provides a new instrument for rapid conditional knockdown at the protein level in *N. caninum*.

This usefulness was proven during the characterization of NCLIV_049870 and its orthologue TGGT1_235420. Although yet to be thoroughly characterized, the nuclear proteins in both parasites are essential for parasite growth inside the vacuole. An initial analysis of these genes shows orthologues in other species within the family, and the predicted amino acid sequence shares 60% of identity between *T. gondii* and *N. caninum*. While there are no definitive conserved motifs in the proteins that would denote a specific function, analysis of the sequence hints to its nuclear role, probably chromatin-remodeling related. Evolutionary analysis by OrthoMCL indicates that both proteins originated from the ancestor *Sphaeroforma arctica*, which contains a helicase-SANT-associated (HSA) domain that acts as chromatin remodelers by binding nuclear actin-related proteins (48). Although this domain is not preserved in *T. gondii*, *N. caninum*, and the closest phylogenetic species, orthologues in *Cyclospora cayentanensis*, *Plasmodium* spp and *Cryptosporidium* spp still contain the HSA domain. In addition, NCLIV_049870 is annotated as “GH22120, related” in ToxoDB, referring to a *Drosophila grimshawi* protein with repeated mucin-like domains. Human proteins containing such domains as MUC-1C are also involved in chromatin remodeling and are indicators of cancer progression and poor clinical outcome (49, 50). Finally, String database prediction for functional partners of these proteins are all chromatin-related: TGME49_267800 (DRPA), TGME49_203950 (BDP), TGME49_289730 (Pep3/Vps18/deep orange family).

In conclusion, it is well known that molecular genetics provides powerful investigative approaches that can greatly improve our understanding of intracellular pathogens and their interactions with host cells. This study dramatically improves the ability for genetic manipulation of *N. caninum*, similar to the tools available in *T. gondii*. The development of molecular genetics for *N. caninum* will enhance knowledge of neosporosis, enable a better comparison of *N. caninum* and *T. gondii*, and provide an efficient heterologous expression system to unravel the processing, targeting, and function of *T. gondii* proteins.

MATERIALS AND METHODS

Host cells and parasite culture. Parental NcLiv and modified strains of *N. caninum*, as well as RH Δ hxgprt Δ ku80 and modified strains of *T. gondii*, were maintained on confluent monolayers of human foreskin fibroblast (HFF) cells, cultured in complete Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 5% Fetal Bovine Serum (Gibco), 5% Cosmic Calf Serum (HyClone), 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin, at 37°C in 5% CO₂ atmosphere, as previously described (51, 52).

In silico analysis of POI. All general information on proteins of interest (POIs) such as sequences, essentiality, genomic location, orthology profile, among others, were obtained at ToxoDB (www.toxodb.org). Orthologous grouping of evolutive and expanded families of POIs were predicted by OrthoMCL (orthomcl.org) and Eukaryotic Pathogen, Vector and Host Informatics Resource (VEuPathDB, veupathdb.org), based on amino acid sequences. We used SignalP 6.0 (services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-6.0) for the prediction of signal peptides and cleavage sites of the POI sequences and TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/>

services/TMHMM/) for the prediction of transmembrane helices. Prediction of structure and/or function of the POIs was performed on the Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0 (PHYRE2, www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2). For detection of tandem repeats in the studied POI, we used Rapid Automatic Detection and Alignment of Repeats in Protein Sequences (RADAR, www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/radar), along with manual curation of the data. B cell immunogenicity and linear epitope predictions were obtained at Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB, www.iedb.org), through the following tools: Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 (53); Parker Hydrophilicity Prediction (54); Emini Surface Accessibility Prediction (55); and Karplus & Schulz Flexibility Prediction (56). String (string-db.org) was used for the prediction of potential protein interactions and functional enrichment analysis.

Epitope tagging. We used CRISPR/Cas9 for endogenous tagging of genes of interest—NCLIV_056045/NcKu80 (primers P1-P4), NCLIV_064150/NcKu70 (primers P5-P8), NCLIV_069360/NcGRA48 (primers P9-P12), NCLIV_066730/NSG1 (primers P13-P16), NCLIV_049870 (primers P17-P20)—with 3xHA, as previously described (29). Oligonucleotides used for this and other purposes are listed in Table S1. Briefly, sequences encoding gRNAs were ligated into the pU6 Universal plasmid and prepared along with a PCR product from the *pJC:3xHA:DHFR* vector with 40 bp flanking regions for recombination at the 3' end of each gene. Transfection was performed in 2 mm gap cuvettes with 400 μ L of cytomix containing 10^7 freshly lysed tachyzoites, 100 μ g of each construct, and CaCl_2 (150 μ M), using single pulses of 1.5–2.0 ms at 1.5 kV, 25 Ω and 25 μ F in an electroporator (Bio-Rad), as previously described (19). Parasites were then selected in medium containing 1 μ M pyrimethamine and cloned by limiting dilution. Tagged clones were screened by IFA using the HA.11 monoclonal antibody (BioLegend). Cross-reactive rabbit antibodies against *Toxoplasma* IMC12 (Back et al., unpublished data) were used to stain the periphery of the parasites. Epitope tagging efficiency was calculated by counting the HA positive vacuoles versus IMC12 positive vacuoles at 14 days posttransfection. At least 100 vacuoles per strain were counted to determine the percentage of parasites successfully tagged.

Gene disruption. CRISPR/Cas9 and homologous recombination were used to disrupt selected targets, as previously described (29). For *NcHXGPRT* (NcLiv Δ hxgprt), a single sgRNA (primers P21/P22) was used to disrupt the GOI's coding region. For *NcKu80* (NcLiv Δ h Δ k), flanking sequences from the 5'UTR (forward, 559 bp) and 3'UTR (reverse, 528 bp) were amplified from *N. caninum* genomic DNA (primers P23–P26), inserted into a cassette containing *T. gondii* HXGPRT driven by the *N. caninum* GRA7 promoter (pJET1.2::pNcGRA7:TgHXGPRT), and transfected into NcLiv Δ hxgprt parasites with a gRNA (primers P27/P28) directed to the beta-barrel domain of the gene. To remove the selectable marker, NcLiv Δ h Δ k parasites were transfected with a gRNA (primers P29/P30) directed to the *TgHXGPRT* coding region and an *AccI* truncated version of the original cassette as a repair template (–1633 bp). This eliminated most of the *NcGRA7* promoter and *TgHXGPRT* coding region, although retaining approximately 2000 bp for efficient homologous recombination. To generate NcLiv Δ 069360/NcGRA48 and NcLiv Δ 066730/NSG1 strains, epitope tagged NcLiv Δ h Δ k parasites were transfected with sgRNA directed to the GOI's coding regions, along with a PCR product from the *pJET1.2::pNcGRA7:TgHXGPRT* with 39 bp homology sequences of its UTR regions (NcGRA48: primers P31–P34; NSG1: primers P35–P38).

Auxin-inducible degron modifications to *N. caninum*. To produce *N. caninum* stably expressing the transport inhibitor response 1 (Tir1) auxin receptor from *Oryza sativa*, the original plasmids generated and codon optimized for *T. gondii* (pTgTUB1:OsTIR1-3xFLAG, TgSAG1:CAT) (31) were adapted to the *N. caninum* system by Gibson assembly. Briefly, the *Toxoplasma* TUB1 promoter was replaced by the *Neospora* GRA7 promoter (pNcGRA7, primers P39–P42). In addition, the selectable marker used was also changed to *TgHXGPRT* instead of *chloramphenicol acetyltransferase* (CAT) used in the original description (primers P43–P46). These changes generated the plasmid *pNcGRA7:OsTIR1-3xFLAG, TgSAG1:TgHXGPRT*, used in this work. NcLiv Δ h Δ k parasites were transfected with this linearized construct, selected with Mpa/X, cloned by limiting dilution, and a clone was chosen with strong cytoplasmic staining with the M2 anti-Flag Mab (Sigma). The original *pTgTUB1:YFP-mAID-3xHA, HXGPRT* plasmid, containing the mAID sequence for proteasomal degradation, was altered by changing its selectable marker to *DHFR*, generating the *pTgTUB1:YFP-mAID-3xHA, DHFR* plasmid (31). For depletion of AID fusion proteins, the parasites were treated with 500 μ M indoleacetic acid (IAA) added at the time of infection for the specified time periods.

Plaque assays. Six-well plates were seeded with confluent monolayers of HFFs and infected with approximately 250 parasites (± 500 μ M IAA) and allowed to form plaques for 6 days for *T. gondii* and 8 days for *N. caninum*. The monolayers were then fixed in 100% methanol for 3 min, washed with phosphate-buffered saline (PBS), and stained with crystal violet for visualization. The number of plaques were quantified from the samples and the plaque assays were performed in triplicate.

Immunofluorescence assay and fluorescence microscopy. For IFAs, tachyzoites were used to infect coverslips of HFFs for 24 h. The coverslips were then fixed in 3.7% formaldehyde/PBS for 15 min. The coverslips were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and blocked and permeabilized in a solution containing PBS/3% bovine serum albumin (BSA)/0.2% Triton X-100 for 30 min. Samples were then incubated with mouse monoclonal anti-HA antibodies (HA.11, BioLegend) and rabbit anti-IMC12 (Back et al., unpublished data) diluted in PBS, along with BSA (3%) and Triton X-100 (0.2%) for 1 h. The samples were then washed in PBS and treated with species-specific secondary antibodies conjugated to Alexa 594/488, and diluted 1:2000 in PBS/3%BSA/0.2%TX-100. Hoechst staining was performed using Hoechst 33342 (5 μ g/mL) in PBS for 5 min. Following a new washing cycle, coverslips were mounted onto microscope slides with Vectashield (Vector Labs) mounting media, and the fluorescence was observed using a Zeiss Axio Imager Z1 microscope. Images were processed via deconvolution using the Zeiss Zen software.

Western blot analysis. Whole-parasite lysates were separated by 10% SDS-PAGE. Samples were transferred to nitrocellulose overnight and probed with primary antibodies. For all secondary antibody incubations, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse or goat anti-rabbit antibodies

were used at a 1:2000 dilution. Following secondary incubation, a chemiluminescent substrate was used for the detection of HRP activity.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

FIG S1, TIF file, 1 MB.

TABLE S1, PDF file, 0.02 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank David Sibley for sharing the NcLIV strain as well as the *Toxoplasma* TIR1 plasmid. The authors also thank members of the Bradley and Mineo labs for their reading and comments of the manuscript. The funders of the study had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

REFERENCES

- Smith NC, Goulart C, Hayward JA, Kupz A, Miller CM, van Dooren GG. 2021. Control of human toxoplasmosis. *Int J Parasitol* 51:95–121. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.11.001>.
- Lindsay DS, Dubey JP. 2020. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants: an update. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 36: 205–222. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.11.004>.
- Reichel MP, Alejandra Ayanegui-Alcérreca M, Gondim LFP, Ellis JT. 2013. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle—the billion dollar question. *Int J Parasitol* 43:133–142. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.022>.
- Soete M, Hettman C, Soldati D. 1999. The importance of reverse genetics in determining gene function in apicomplexan parasites. *Parasitology* 118:53–61. <https://doi.org/10.1017/s003118209900414x>.
- Di Cristina M, Carruthers VB. 2018. New and emerging uses of CRISPR/Cas9 to genetically manipulate apicomplexan parasites. *Parasitology* 145:1119–1126. <https://doi.org/10.1017/S003118201800001X>.
- Boothroyd JC. 2020. What a difference 30 years makes! A perspective on changes in research methodologies used to study *Toxoplasma gondii*. *Methods Mol Biol* 2071:1–25. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9857-9_1.
- Howe DK, Mercier C, Messina M, Sibley LD. 1997. Expression of *Toxoplasma gondii* genes in the closely-related apicomplexan parasite *Neospora caninum*. *Mol Biochem Parasitol* 86:29–36. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)90003-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)90003-7).
- Howe DK, Sibley LD. 1997. Development of molecular genetics for *Neospora caninum*: a complementary system to *Toxoplasma gondii*. *Methods* 13:123–133. <https://doi.org/10.1006/meth.1997.0505>.
- Beckers CJ, Wakefield T, Joiner KA. 1997. The expression of *Toxoplasma* proteins in *Neospora caninum* and the identification of a gene encoding a novel rhoptry protein. *Mol Biochem Parasitol* 89:209–223. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00120-5](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00120-5).
- Zhang G, Huang X, Boldbaatar D, Battur B, Battsetseg B, Zhang H, Yu L, Li Y, Luo Y, Cao S, Goo Y-K, Yamagishi J, Zhou J, Zhang S, Suzuki H, Igarashi I, Mikami T, Nishikawa Y, Xuan X. 2010. Construction of *Neospora caninum* stably expressing TgSAG1 and evaluation of its protective effects against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Vaccine* 28:7243–7247. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.096>.
- Lei T, Wang H, Liu J, Nan H, Liu Q. 2014. ROP18 is a key factor responsible for virulence difference between *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *PLoS One* 9:e99744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099744>.
- Franco M, Shastri AJ, Boothroyd JC. 2014. Infection by *Toxoplasma gondii* specifically induces host c-Myc and the genes this pivotal transcription factor regulates. *Eukaryot Cell* 13:483–493. <https://doi.org/10.1128/EC.00316-13>.
- Franco M, Panas MW, Marino ND, Lee M-CW, Buchholz KR, Kelly FD, Bednarski JJ, Slickman BP, Pourmand N, Boothroyd JC. 2016. A novel secreted protein, MYR1, is central to *Toxoplasma*'s manipulation of host cells. *mBio* 7:e02231-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.02231-15>.
- Collantes-Fernandez E, Arrighi RBG, Alvarez-García G, Weidner JM, Regidor-Cerrillo J, Boothroyd JC, Ortega-Mora LM, Barragan A. 2012. Infected dendritic cells facilitate systemic dissemination and transplacental passage of the obligate intracellular parasite *Neospora caninum* in mice. *PLoS One* 7:e32123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032123>.
- Donald RG, Carter D, Ullman B, Roos DS. 1996. Insertional tagging, cloning, and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene: use as a selectable marker for stable transformation. *J Biol Chem* 271:14010–14019. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.24.14010>.
- Pereira LM, Baroni L, Yatsuda AP. 2014. A transgenic *Neospora caninum* strain based on mutations of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Exp Parasitol* 138:40–47. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.01.004>.
- Pereira LM, Yatsuda AP. 2014. The chloramphenicol acetyltransferase vector as a tool for stable tagging of *Neospora caninum*. *Mol Biochem Parasitol* 196:75–81. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.08.001>.
- Shen B, Brown KM, Lee TD, Sibley LD. 2014. Efficient gene disruption in diverse strains of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/CAS9. *mBio* 5:e01114-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01114-14>.
- Sidik SM, Hackett CG, Tran F, Westwood NJ, Lourido S. 2014. Efficient genome engineering of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/Cas9. *PLoS One* 9:e100450. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100450>.
- Arranz-Solís D, Regidor-Cerrillo J, Lourido S, Ortega-Mora LM, Saeij JPJ. 2018. *Toxoplasma* CRISPR/Cas9 constructs are functional for gene disruption in *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 48:597–600. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.03.002>.
- Yang C, Liu J, Ma L, Zhang X, Zhang X, Zhou B, Zhu X, Liu Q. 2018. NcGRA17 is an important regulator of parasitophorous vacuole morphology and pathogenicity of *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 264:26–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.018>.
- Nishikawa Y, Shimoda N, Fereig RM, Moritaka T, Umeda K, Nishimura M, Ihara F, Kobayashi K, Himori Y, Suzuki Y, Furuoka H. 2018. *Neospora caninum* dense granule protein 7 regulates the pathogenesis of neosporosis by modulating host immune response. *Appl Environ Microbiol* 84:e01350-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01350-18>.
- Wang F, Wang X, Song X, Ma L, Yang J, Liu Q, Liu J. 2021. Function of *Neospora caninum* dense granule protein 7 in innate immunity in mice. *Parasitol Res* 120:197–207. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06961-4>.
- Dong J, Zhang N, Zhao P, Li J, Cao L, Wang X, Li X, Yang J, Zhang X, Gong P. 2021. Disruption of dense granular protein 2 (GRA2) decreases the virulence of *Neospora caninum*. *Front Vet Sci* 8:634612. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.634612>.
- Wang C, Yang C, Liu J, Liu Q. 2020. NcPuf1 is a key virulence factor in *Neospora caninum*. *Pathogens* 9:1019. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121019>.
- Huynh M-H, Carruthers VB. 2009. Tagging of endogenous genes in a *Toxoplasma gondii* strain lacking Ku80. *Eukaryot Cell* 8:530–539. <https://doi.org/10.1128/EC.00358-08>.
- Fox BA, Ristuccia JG, Giggley JP, Bzik DJ. 2009. Efficient gene replacements in *Toxoplasma gondii* strains deficient for nonhomologous end joining. *Eukaryot Cell* 8:520–529. <https://doi.org/10.1128/EC.00357-08>.
- Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. 2001. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412:607–614. <https://doi.org/10.1038/35088000>.
- Nadipuram SM, Thind AC, Rayatpisheh S, Wohlschlegel JA, Bradley PJ. 2020. Proximity biotinylation reveals novel secreted dense granule proteins of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *PLoS One* 15:e0232552. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232552>.
- Back PS, O'Shaughnessy WJ, Moon AS, Dewangan PS, Hu X, Sha J, Wohlschlegel JA, Bradley PJ, Reese ML. 2020. Ancient MAPK ERK7 is regulated by an unusual inhibitory scaffold required for *Toxoplasma* apical

- complex biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:12164–12173. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921245117>.
31. Brown KM, Long S, Sibley LD. 2018. Conditional knockdown of proteins using auxin-inducible degron (AID) fusions in *Toxoplasma gondii*. *Bio Protoc* 8:e2728.
 32. Sidik SM, Huet D, Ganesan SM, Huynh M-H, Wang T, Nasamu AS, Thiru P, Saeij JPJ, Carruthers VB, Niles JC, Lourido S. 2016. A genome-wide CRISPR screen in *Toxoplasma* identifies essential apicomplexan genes. *Cell* 166:1423–1435.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.019>.
 33. Beraki T, Hu X, Broncel M, Young JC, O'Shaughnessy WJ, Borek D, Treeck M, Reese ML. 2019. Divergent kinase regulates membrane ultrastructure of the *Toxoplasma* parasitophorous vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:6361–6370. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816111116>.
 34. Sangaré LO, Yang N, Konstantinou EK, Lu D, Mukhopadhyay D, Young LH, Saeij JPJ. 2019. *Toxoplasma* GRA15 activates the NF- κ B Pathway through Interactions with TNF receptor-associated factors. *mBio* 10:e00808-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00808-19>.
 35. Mukhopadhyay D, Arranz-Solís D, Saeij JPJ. 2020. *Toxoplasma* GRA15 and GRA24 are important activators of the host innate immune response in the absence of TLR11. *PLoS Pathog* 16:e1008586. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008586>.
 36. Braun L, Brenier-Pinchart M-P, Yogavel M, Curt-Varesano A, Curt-Bertini R-L, Hussain T, Kieffer-Jaquinod S, Coute Y, Pelloux H, Tardieux I, Sharma A, Belrhali H, Bougdour A, Hakimi M-A. 2013. A *Toxoplasma* dense granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by promoting a direct and sustained host p38 MAPK activation. *J Exp Med* 210:2071–2086. <https://doi.org/10.1084/jem.20130103>.
 37. Olias P, Etheridge RD, Zhang Y, Holtzman MJ, Sibley LD. 2016. *Toxoplasma* effector recruits the Mi-2/NuRD complex to repress STAT1 transcription and block IFN- γ -dependent gene expression. *Cell Host Microbe* 20:72–82. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.06.006>.
 38. Gay G, Braun L, Brenier-Pinchart M-P, Voltaire J, Josserand V, Bertini R-L, Varesano A, Touquet B, De Bock P-J, Coute Y, Tardieux I, Bougdour A, Hakimi M-A. 2016. *Toxoplasma gondii* TgIST co-opts host chromatin repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN- γ -mediated host defenses. *J Exp Med* 213:1779–1798. <https://doi.org/10.1084/jem.20160340>.
 39. Rosenberg A, Sibley LD. 2021. *Toxoplasma gondii* secreted effectors co-opt host repressor complexes to inhibit necroptosis. *Cell Host Microbe* 29:1186–1198.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.04.016>.
 40. Liew FY, Millott SM, Schmidt JA. 1990. A repetitive peptide of *Leishmania* can activate T helper type 2 cells and enhance disease progression. *J Exp Med* 172:1359–1365. <https://doi.org/10.1084/jem.172.5.1359>.
 41. Stahl HD, Crewther PE, Anders RF, Brown GV, Coppel RL, Bianco AE, Mitchell GF, Kemp DJ. 1985. Interspersed blocks of repetitive and charged amino acids in a dominant immunogen of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:543–547. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.2.543>.
 42. Gao W, Wortis HH, Pereira MA. 2002. The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase is a T cell-independent B cell mitogen and an inducer of non-specific Ig secretion. *Int Immunol* 14:299–308. <https://doi.org/10.1093/intimm/14.3.299>.
 43. Pinheiro AF, Borsuk S, Berne MEA, Pinto L da S, Andreotti R, Roos T, Roloff BC, Leite FPL. 2013. Expression of *Neospora caninum* NcSRS2 surface protein in *Pichia pastoris* and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. *Pathog Glob Health* 107:116–121. <https://doi.org/10.1179/2047773213Y.0000000082>.
 44. Ybañez RHD, Terkawi MA, Kameyama K, Xuan X, Nishikawa Y. 2013. Identification of a highly antigenic region of subtilisin-like serine protease 1 for serodiagnosis of *Neospora caninum* infection. *Clin Vaccine Immunol* 20:1617–1622. <https://doi.org/10.1128/CVI.00352-13>.
 45. Pereira HS, E Almeida LT, Fernandes V, Senra RL, Fontes PP, Bittar ER, Ribon A, de OB, Rotta PP, Menezes-Souza D, Bittar JFF, de Mendes TAO. 2020. Chimeric protein designed by genome-scale immunoinformatics enhances serodiagnosis of bovine neosporosis. *J Clin Microbiol* 58:e01343-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01343-19>.
 46. Goto Y, Carter D, Reed SG. 2008. Immunological dominance of *Trypanosoma cruzi* tandem repeat proteins. *Infect Immun* 76:3967–3974. <https://doi.org/10.1128/IAI.00604-08>.
 47. Goto Y, Carter D, Guderian J, Inoue N, Kawazu S-I, Reed SG. 2010. Upregulated expression of B-cell antigen family tandem repeat proteins by *Leishmania* amastigotes. *Infect Immun* 78:2138–2145. <https://doi.org/10.1128/IAI.01102-09>.
 48. Szerlong H, Hinata K, Viswanathan R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Cairns HS. 2008. The HSA domain binds nuclear actin-related proteins to regulate chromatin-remodeling ATPases. *Nat Struct Mol Biol* 15:469–476. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1403>.
 49. Hata T, Rajabi H, Takahashi H, Yasumizu Y, Li W, Jin C, Long MD, Hu Q, Liu S, Fushimi A, Yamashita N, Kui L, Hong D, Yamamoto M, Miyo M, Hiraki M, Maeda T, Suzuki Y, Samur MK, Kufe D. 2019. MUC1-C activates the NuRD complex to drive dedifferentiation of triple-negative breast cancer cells. *Cancer Res* 79:5711–5722. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1034>.
 50. Yamamoto M, Jin C, Hata T, Yasumizu Y, Zhang Y, Hong D, Maeda T, Miyo M, Hiraki M, Suzuki Y, Hinohara K, Rajabi H, Kufe D. 2019. MUC1-C integrates chromatin remodeling and PARP1 activity in the DNA damage response of triple-negative breast cancer cells. *Cancer Res* 79:2031–2041. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3259>.
 51. Donald RG, Roos DS. 1993. Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: a selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:11703–11707. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.11703>.
 52. Sohn CS, Cheng TT, Drummond ML, Peng ED, Vermont SJ, Xia D, Cheng SJ, Wastling JM, Bradley PJ. 2011. Identification of novel proteins in *Neospora caninum* using an organelle purification and monoclonal antibody approach. *PLoS One* 6:e18383. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018383>.
 53. Jaspersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. 2017. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res* 45:W24–W29. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx346>.
 54. Parker JM, Guo D, Hodges RS. 1986. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* 25:5425–5432. <https://doi.org/10.1021/bi00367a013>.
 55. Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, Boger J. 1985. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol* 55:836–839. <https://doi.org/10.1128/JVI.55.3.836-839.1985>.
 56. Karplus PA, Schulz GE. 1985. Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften* 72:212–213. <https://doi.org/10.1007/BF01195768>.