

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Jair Lage de Siqueira Neto

**“Caracterização de proteínas que se associam *in vivo* com a
simples-fita telomérica de *Leishmania amazonensis*”**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética de
Microorganismos.

Orientadora: Profª. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano

Campinas, 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Si75c	Siqueira Neto, Jair Lage de Caracterização de proteínas que se associam <i>in vivo</i> com a simples-fita telomérica de <i>Leishmania amazonensis</i> / Jair Lage de Siqueira Neto. – Campinas, SP: [s.n.], 2007. Orientadora: Maria Isabel Nogueira Cano. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Telômeros. 2. <i>Leishmania amazonensis</i>. 3. Proteína de Replicação A. 4. Proteína RBP38. I. Cano, Maria Isabel Nogueira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título. (rcdt/vib)
--------------	--

Título em inglês: Characterization of the *in vivo* telomeric single-strand binding proteins from *Leishmania amazonensis*.

Palavras-chave em inglês: Telomeres; *Leishmania amazonensis*; Replication Protein A; RBP38 protein.

Área de concentração: Genética de Microorganismos.

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Maria Isabel Nogueira Cano, José Franco da Silveira Filho, Mário Henrique de Barros, Hernandes Faustino de Carvalho, Edl Lúcia Sartorato.

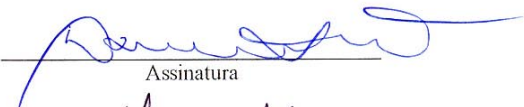
Data da defesa: 01/06/2007.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 01 de junho de 2007

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano (Orientadora)



Assinatura

Profa. Dr. Mário Henrique de Barros



Assinatura

Prof. Dr. José Franco da Silveira



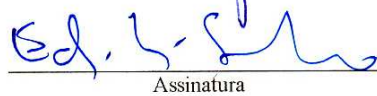
Assinatura

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho



Assinatura

Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato



Assinatura

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira



Assinatura

Prof. Dr. Ivan Godoy Maia



Assinatura

Prof. Dr. Fábio Trindade Maranhão Costa



Assinatura

AGRADECIMENTOS:

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade de viver a vida que vivo, ao lado de pessoas tão especiais.

Agradeço a toda minha família, a começar pelos meus pais Jair e Bethânia, por toda a educação, formação, apoio e carinho concedidos sempre. Minha esposa Miriam, que caminhou ao meu lado, me ergueu em momentos difíceis, sempre me incentivando, e sabe melhor que qualquer um o quanto foi difícil conquistarmos cada pequena etapa deste processo dos nossos doutoramentos. Meus irmãos, Chris e Rapha, que sempre estiveram ao meu lado torcendo por mim. Agradeço meus avós pelo carinho e por todos os ensinamentos e sábias palavras a mim dirigidas. Agradeço meus padrinhos Jackson e Miriam pelo exemplo que são e pelo apoio sempre concedido. Agradeço de forma especial o meu tio David, que foi o grande responsável por despertar em mim a curiosidade científica. Lembro-me da visita que fiz ao seu laboratório na UFMG e ter visto um insetário de barbeiros, vetores da doença de Chagas! E aqui hoje estou eu, me doutorando com estudos em Leishmaniose...

Agradeço a professora Dra. Maria Isabel Cano pela orientação e por proporcionar condições para que eu pudesse desenvolver meu trabalho de doutorado e crescer enquanto pessoa e cientista. Agradeço também a todos aqueles que participaram da minha formação como pesquisador: profa. Dra. Edi Sartorato, minha primeira orientadora, e Dra. Camila de Oliveira, minha primeira supervisora, que me ensinaram os primeiros passos em um laboratório. O Dr. Goran Nesic, pelos grandes ensinamentos concedidos no laboratório de bioinformática da Embrapa. Os professores de graduação que contribuíram para a formação do meu conhecimento.

Aos colegas de laboratório, Maribel, Fábio, Joseane, Denise, Marcelo, Arina, Rita e em especial Tininha e Miriam, agradeço por todos os momentos compartilhados no laboratório e fora dele, pelas discussões científicas ou meramente filosóficas. Agradeço também meus grandes amigos de Campinas, André (e Patrícia), Victor (e Priscila), Adalberto, Gilmar, Bia, Jorge, Ana Flávia, Renato, Marina companheiros para todas as horas!

Ao meu supervisor Dr. Lúcio Freitas-Junior por todo ensinamento e hospitalidade concedidos durante meu estágio na Coreia. Também aos colegas no laboratório em Seoul: Hyun-

Rim, Min-Je, Gyong-Seon, Isabelle e em especial, Dr. Fernando Dossin e Carolina Moraes pelo apoio, ajuda e discussões científicas de alto nível.

Aos colaboradores e colegas do LNLS: professor Dr. Carlos Ramos, Dr. Leticia Khater, Veruska, Dr. Nílson e Bia. Aos colaboradores e colegas da imunologia Luis Peroni e José Raimundo. Aos colaboradores professor Dr. Luis Tosi e Dr. Fábio Squina de Ribeirão Preto que me auxiliaram na padronização do protocolo de transfecção de Leishmania. Aos colaboradores professor Dr. Franco da Silveira, professor Dr. Renato Mortara e professora Dra. Clara Lúcia da Escola Paulista de Medicina por emprestar um eletroporador, ajudar em protocolos de microscopia e conceder um fluxo laminar, respectivamente. Ao professor Dr. Fábio Costa por me auxiliar na padronização dos protocolos iniciais de imunofluorescência e emprestar o microscópio recém adquirido para dar início à aquisição das imagens.

Aos meus representantes discentes, Mariana Lira e Luis Peroni, que tanto me auxiliaram nas questões burocráticas do doutorado. Também agradeço a Zaira e Maria de Lourdes por cuidarem tão bem dos nossos documentos na pós! Em especial aos coordenadores Dr. Anete Pereira e Dr. Marcelo Menossi pela competência e excelência em administrar o curso de pós-graduação em genética e biologia molecular.

Aos professores Dr. Hernandes Carvalho e Dr. Fábio Costa pelas sugestões e críticas apresentadas na banca prévia. Aos professores Dr. Franco da Silveira, Dr. Mário Barros, Dra. Edi Sartorato e Dr. Hernandes Carvalho por aceitarem participar da avaliação deste trabalho.

Agradeço ainda ao time de futsal da Biologia Unicamp por proporcionar um descanso intelectual e pelos momentos de emoção vividos ao longo dos meus anos em Campinas. Sem estes momentos eu não teria a mesma força e entusiasmo para me dedicar ao laboratório

À CAPES por conceder minha bolsa de doutorado e À Organização Mundial da Saúde por financiar o projeto de doutorado.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE ABREVIACÕES	x
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O gênero <i>Leishmania</i> e características do parasita	1
1.1.1. Ciclo de vida do parasita	2
1.1.2. Classificação taxonômica	4
1.2. A leishmaniose	5
1.2.1. Classificação clínica	5
1.2.2. Distribuição geográfica e epidemiologia	6
1.2.3. Diagnóstico	8
1.2.4. Tratamento	9
1.2.5. Organização genômica dos parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	10
1.3. Telômeros e o controle da estabilidade genômica	11
1.3.1. Manutenção dos telômeros pela telomerase	14
1.3.2. Composição do complexo telomérico e organização de suas proteínas	15
1.3.3. Proteínas que interagem com a simples-fita telomérica rica em G	17
1.3.3.1. CDC13 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
1.3.3.2. POT1 de humanos e <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	20
1.3.3.3. TEBP de <i>Oxytricha nova</i>	21

1.4. Os telômeros de protozoário tripanosomatídeos	23
1.4.1. Proteínas que interagem com a simple fita telomérica de <i>L. amazonensis</i>	25
1.4.1.1. A proteína RPA	25
1.4.1.2. RPA nos telômeros	28
1.4.1.3 A proteína RBP38	30
2. OBJETIVOS	32
3. RESULTADOS	33
3.1. Artigo I: <i>Leishmania</i> Replication Protein A-1 binds <i>in vivo</i> single-stranded telomeric DNA	34
3.2. Material e métodos referentes aos resultados complementares	42
3.2.1. Clonagem dos genes <i>LaRPA-1</i> e <i>LaRBP38</i> em vetor de clonagem para produtos de PCR	42
3.2.2. Organização genômica dos genes <i>LaRPA-1</i> e <i>LaRBP38</i>	44
3.2.3. Mapeamento cromossômico dos genes <i>LaRPA-1</i> e <i>LaRBP38</i>	44
3.2.4. Subclonagem dos genes <i>LaRPA-1</i> e <i>LaRBP38</i> em vetor de expressão pET-28a(+) e produção de proteínas recombinantes	45
3.2.5. Ressolubilização das proteínas recombinantes LaRPA-1 e LaRBP38	46
3.2.6. Estimativa do coeficiente de dissociação (K_d) entre LaRPA-1 e LaRPA-1 ^{ΔCterm} , e DNAsf telomérico	47
3.2.7. Imunização de coelhos para produção de anticorpos	48
3.2.8. Purificação dos anticorpos anti-LaRPA-1 em coluna de CNBr	48
3.2.9. Imunodeteção de proteínas por Western blotting	48
3.2.10. Clonagem dos genes <i>LaRPA-1</i> e <i>LaRBP38</i> em pX63Neo	49
3.2.11. Transformação de <i>L. amazonensis</i> com vetores LaRPA-1/pX63Neo ou LaRBP38/pX63Neo para os ensaios de superexpressão	49
3.2.12. Expressão em <i>Leishmania</i> da proteína LaRPA-1 em fusão com GFP	50
3.2.13. Imunoprecipitação da cromatina	50

3.2.14. Imunofluorescência para análise da localização subcelular das proteínas LaRPA-1 e LaRBP38	50
3.3. Resultados Complementares	51
3.3.1. Resultados referentes à proteína LaRPA-1	51
3.3.1.1. Caracterização do gene <i>LaRPA-1</i>	51
3.3.1.2. Determinação da afinidade de LaRPA-1 e LaRPA-1 ^{ΔCterm} pelo DNAsf telomérico	53
3.3.1.3. Tentativa de superexpressão da proteína LaRPA-1 em <i>L. amazonensis</i>	55
3.3.1.4. Superexpressão da proteína LaRPA-1 em fusão com GFP em <i>L. amazonensis</i>	56
3.3.2. Resultados referentes à proteína LaRBP38	59
3.3.2.1. Caracterização do gene LaRBP38	59
3.3.2.2. A produção de LaRBP38 recombinante	61
3.3.2.3. A proteína LaRBP38 é expressa em <i>L. amazonensis</i>	63
3.3.2.4. LaRBP38 se associa <i>in vivo</i> ao DNA telomérico de <i>L. amazonensis</i>	64
3.3.2.5. Localização subcelular da proteína LaRBP38	65
4. DISCUSSÃO	66
4.1. LaRPA-1 deve cumprir um papel regulatório nos telômeros de <i>Leishmania</i>	67
4.2. LaRBP38 pode ser uma proteína multifuncional em diferentes organelas	69
5. CONCLUSÕES	71
6. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA COMPLEMENTAR	73
6.1. Artigos produzidos em parte com resultados desta tese	73
6.1.1. Artigo II: LaRbp38: a <i>Leishmania amazonensis</i> protein that binds nuclear and kinetoplast DNAs	73
6.1.2. Artigo III: Telomere Biology of Trypanosomatids: beginning to answer some questions	74
6.2. Artigos em co-autoria	75

6.2.1. Artigo IV: The putative telomerase reverse transcriptase component of <i>Leishmania amazonensis</i> : gene cloning and characterization	75
6.2.2. Artigo V: LaTBP1: A <i>Leishmania amazonensis</i> DNA-binding protein that associates <i>in vivo</i> with telomeres and GT-rich DNA using a MYB-like domain	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXO I	92

LISTA DE ABREVIACÕES

Ac: Anticorpo

Blast: “basic local alignment and search tool”

BSA: albumina sérica bovina

CDC13: proteína ciclo de divisão celular ("cell division cycle 13")

CDD: “Conserved Domain Database”

cDNA: DNA complementar

cDNA_{df}: DNA complementar dupla-fita

dATP: desoxiadenosina-trifosfato

dGTP: desoxiguanosina-trifosfato

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNA_{df}: DNA dupla-fita

DNase: desoxirribonuclease A

DNA_{sf}: DNA simples-fita

dNTP: desoxinucleosídeo-trifosfato

DTT: 1,4-ditiotreitol

EDTA: ácido etileno diamino tetracético

EGTA: ácido etileneglicol-bis-(β-aminoetil)-N,N,N',N' tetracético

ELISA: “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”

EMSA: "Electrophoretic Mobility Shift Assays"

Est (1-3): "Ever shorter telomeres"

EtOH: etanol

Hepes: ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico

IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

K_d : constante de dissociação

kDa: quilo Daltons

kDNA: DNA mitocondrial de Kinetoplastida (“kinetoplast DNA”)

KAc: acetato de potássio
 LaGT "*Leishmania amazonensis* G-strand telomeric protein"
 LaRBP38: *Leishmania amazonensis* "RNA binding protein"
 LaRPA-1: *Leishmania amazonensis* "replication protein" A-1
 LC: leishmaniose cutânea
 LCD: leishmaniose cutânea difusa
 LMC: leishmaniose mucocutânea
 LTA: leishmaniose tegumentar americana
 LV: leishmaniose visceral
 Mb: mega pares de base
 MeOH: metanol
 mRNA: RNA mensageiro
 MS/MS: "Tandem mass spectrometry"
 NaAc: acetato de sódio
 NH₄OAc: acetato de amônia
 NP-40: nonidet P-40
 nt nucleotídeo
 OB-fold: "Oligonucleotide-oligosaccharide-binding fold"
 OD: densidade óptica
 OMS: Organização Mundial da Saúde
 ORF: "open reading frame"
 p/p peso/peso
 p/v peso/volume
 pb: par de bases
 PBS: solução salina tamponada com fosfato
 PCR: reação em cadeia da polimerase
 PFGE: eletroforese de campo pulsado ("Pulse Field Gel Electrophoresis")
 PK: proteinase K
 POT1: proteína protetora dos telômeros ("protection of telomeres 1")

Q-TOF: “Quadrupole Time-of-Flight

RAP1: "Repressor activator protein 1"

RBP38 "RNA binding protein 38"

RFA 2: "Replication factor 2" (subunidade 2 da proteína RPA)

RFLP: “restriction fragment length polymorphism”)

RIF 1-2: “RAP-1 interacting factors 1-2”

RIFI: Imunofluorescência indireta

RNA: ácido ribonucléico

RNase A: ribonuclease A

RPA: proteína de replicação A ("replication protein A")

RPA-1: proteína de replicação A-1 (subunidade 1)

RPA-2: proteína de replicação A-2 (subunidade 2)

RPA-3: proteína de replicação A-3 (subunidade 3)

rRNA RNA ribossômico

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SIR: proteína silenciadora e repressora

SSC: tampão citrato de sódio/cloreto de sódio

T.A.: temperatura ambiente

TAE: tampão Tris-acetato-EDTA

TBE: tampão Tris-borato-EDTA

TE: tampão Tris - EDTA

TEBP "telomere binding protein"

TEBP: “telomere end-binding protein”

TEMED: N, N; N', N'-tetrametiletilenodiamina

TEP: “telomere end proteins”

TER: componente RNA da telomerase (“telomerase RNA”)

TET: componente protéico da telomerase (“telomerase reverse transcriptase”)

TIN2: “TRF2 interacting factor 2”

T-loop: loop do telômero

TRF (1-2) "telomere repeat factor 1-2"

Tris: tris- hidroximetilaminometano

tRNA RNA transportador

TTP: timidina- trifosfato

UV: ultravioleta

v/v: volume/volume

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-tiogalactopiranosídeo

Observações: Algumas das abreviaturas que foram utilizadas neste trabalho estão incluídas no texto da tese com os significados correspondentes.

RESUMO

A leishmaniose é uma parasitose humana emergente e ainda não controlada, causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. Atualmente, a doença atinge mais de 12 milhões de pessoas, não existindo ainda métodos eficientes para seu controle e erradicação. Por estas razões a Organização Mundial da Saúde classifica a leishmaniose como doença de categoria I e incentiva o desenvolvimento de novos métodos para controlar a doença e para buscar novos alvos para drogas contra o parasita.

No presente trabalho, estudou-se as proteínas LaRBP38 e LaRPA-1 previamente identificadas por se associarem *in vitro* com a simples-fita telomérica rica em “G” de *L. amazonensis*.

Os telômeros são as extremidades físicas dos cromossomos de eucariotos, formados por complexos nucleoprotéicos. São responsáveis por conferir estabilidade aos cromossomos, evitando a degradação pela maquinaria de reparo celular e a fusão entre extremidades cromossômicas. Instabilidades no telômero causam normalmente danos irreparáveis à célula, podendo levar à senescência e morte celular.

As proteínas que se mantêm complexadas ao telômero são responsáveis por mantê-lo funcional. Cada proteína desempenha um papel importante, seja na proteção, processo replicativo ou manutenção da estabilidade estrutural do telômero, sendo portanto, alvos potenciais para o desenvolvimento de terapias antiparasitárias.

A proteína RPA é conservada em toda escala evolutiva e cumpre importantes papéis nas maquinarias de replicação, recombinação e reparo do DNA genômico. Nos telômeros, a proteína tem a importante função de recrutar a enzima telomerase, principal responsável pela elongação dos telômeros. Recentemente foi também atribuída à RPA a função de desenovelar estruturas do tipo G-quadruplex formadas pela simples-fita rica em G do DNA telomérico. Desta forma, a RPA permite o acesso da telomerase ao terminal cromossômico.

A proteína RBP38, contrariamente a RPA, é exclusiva de organismos da ordem Kinetoplastida. Foi inicialmente descrita como uma proteína que estabiliza RNA mitocondrial e recentemente foram encontradas evidências de que esta proteína participa também da replicação

do kDNA (DNA mitocondrial dos organismos pertencentes à ordem Kinetoplastida). Um homólogo em *T. cruzi* liga seqüências intergênicas do genoma nuclear *in vitro*. A primeira evidência de que a proteína RBP38 poderia cumprir uma função na maquinaria telomérica surgiu ao se demonstrar sua interação *in vitro* com o DNA telomérico de *Leishmania*.

Resultados presentes nesta tese incluem as clonagens e caracterização dos genes que codificam as proteínas LaRBP38 e LaRPA-1. Em seguida, proteínas recombinantes produzidas em bactérias foram utilizadas para verificar a capacidade de interação com o DNA telomérico, mapear o domínio de LaRPA-1 responsável pela interação com o DNA e ainda produzir anticorpos policlonais. Estes anticorpos foram utilizados em ensaios de imunolocalização e também para verificar que ambas as proteínas co-imunoprecipitam com DNA telomérico *in vivo*. Estes resultados confirmaram que LaRBP38 e LaRPA-1 se associam ao DNA telomérico de *L. amazonensis* e a DNAs ricos em GT *in vivo*. Confirmaram também que LaRPA-1 co-localiza com telômeros no núcleo. Resultados preliminares mostraram que LaRBP38 é encontrada no cinetoplasto, sugerindo que se trata de uma proteína multifuncional. As funções de LaRBP38 e de LaRPA-1 nos telômeros dos parasitas ainda precisam ser estudadas.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an emerging and non-controlled human disease, caused by protozoan belonging to the *Leishmania* genera. More than 12 million people are infected and there are no efficient methods for the controlling or eradication of the disease. For those reasons, the World Health Organization classifies leishmaniasis as category I disease and encourages the development of new methods to control the disease and to find new targets for drugs against the parasite.

In the present work, we studied the proteins LaRBP38 and LaRPA-1, prior identified by *in vitro* assays as proteins that associates with the *Leishmania amazonensis* G-rich single-stranded telomeric DNA.

Telomeres are the physical ends of eukaryote chromosomes formed by proteins and DNA complexes. They are responsible for the chromosome stability, avoiding degradation by the repair machinery and end-to-end fusion. Telomere instability may cause irreversible damage in the cell, leading to senescence and cell death.

The proteins that interact with the telomeres are responsible for the functional dynamics of these structures. Each protein has an important role in the protection, replication process or in the stability maintenance. Therefore, telomeric proteins could be considered good targets for the development of new therapies.

RPA is an evolutionarily conserved protein and plays important roles in replication, recombination and repair machineries. At the telomeres, RPA recruits telomerase, the protein responsible for telomeric elongation. Recently, it was also attributed to RPA the function of unfolding G-quadruplex structures formed by the G-rich single-stranded telomeric DNA. Doing that, RPA allows the access of telomerase to the chromosome ends.

Conversely, RPB38 is a protein exclusive of parasites belonging to the Kinetoplastida order. It was first described as a protein that stabilizes mitochondrial RNA and recently it was also found playing a role in the replication of kDNA (mitochondrial DNA from kinetoplastid organisms). A *T. cruzi* homologue binds *in vitro* intergenic sequences from nuclear genome. The first evidence that this protein could also play a role in the telomeric machinery came from its identification as a *Leishmania* protein that binds *in vitro* telomeric DNA.

The results present here include cloning and characterization of the genes encoding both LaRBP38 and LaRPA-1. In addition, recombinant proteins expressed in *E. coli* were used to check their ability to bind DNA *in vitro*, to map the boundaries of LaRPA-1 DNA binding domain and also used to produce polyclonal antibodies. These antibodies were used in immunolocalization assays and to check if both protein co-immunoprecipitate with telomeric DNA *in vivo* using chromatin immunoprecipitation assay. The results confirmed that LaRBP38 and LaRPA-1 bind *L. amazonensis* telomeric DNA and GT-rich DNAs *in vivo*, and that LaRPA-1 co-localizes with telomeres in the nucleus. Preliminary results show that LaRBP38 is localized at the kinetoplast, suggesting that it is a multifunctional protein that plays different roles in the parasite cell. The functions played by LaRBP38 and LaRPA-1 at parasite telomeres remain to be determined.

1. INTRODUÇÃO

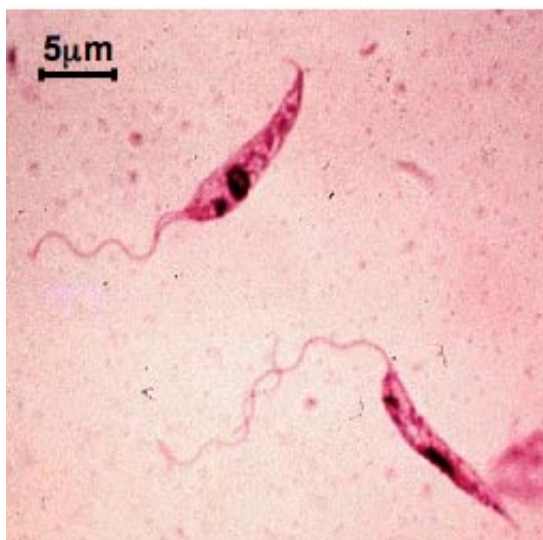
1.1. O gênero *Leishmania* e características do parasita

Os parasitas do gênero *Leishmania* são agentes etiológicos da leishmaniose, uma doença que pode se manifestar de diferentes formas nos homens dependendo da espécie em questão e do sistema imunológico do hospedeiro. Esta doença já estava presente na Índia e no Oriente há vários séculos, e era conhecida como calazar, febre dum-dum ou botão-do-oriental de acordo com os sintomas. Acreditava-se naquele tempo se tratar de doenças completamente distintas. Em 1903, Leishman e Donovan descreveram na Índia o protozoário causador do calazar, que foi batizada de *Piroplasma donovani*. Ronald Ross logo em seguida verificou que não se tratava de um esporozoário e criou o gênero *Leishmania*, denominando a espécie em questão de *L. donovani* (Neves, 2003).

Os parasitas do gênero *Leishmania* são protozoários unicelulares e pertencem ao grupo dos cinetoplastídeos. Este grupo é composto por organismos que apresentam uma mitocôndria única denominada cinetoplasto. Esta organela especial é bastante peculiar, apresentando morfologia fusiforme e sendo rica em DNA mitocondrial (kDNA) organizado na forma de maxicírculos e minicírculos (Simpson, 1987).

Os parasitas podem se apresentar de duas formas: promastigota ou amastigota. A forma promastigota é a forma flagelada encontrada no sistema digestivo do inseto hospedeiro. Esta forma apresenta morfologia alongada com flagelo longo e livre. O núcleo é arredondado ou oval, situando-se na porção mediana ou anterior do parasita. O cinetoplasto em forma de grão ou bastão está localizado entre o núcleo e a extremidade anterior do flagelo. As dimensões desta forma são muito variáveis: de 10 a 40 micrômetros de comprimento e de 1,5 a 3,0 micrômetros no diâmetro menor (Neves et al., 2000). Já a forma amastigota apresenta morfologia arredondada, não apresenta flagelo exteriorizado e está presente no interior das células do organismo hospedeiro vertebrado. O cinetoplasto se apresenta com a mesma morfologia do promastigota, em forma de grão ou bastão. As dimensões do parasita na forma amastigota são de 3,0 a 6,5 micrômetros de diâmetro, dependendo da espécie (Neves et al., 2000, Rey, 2001). A Fig. 1 apresenta ilustrações das duas formas.

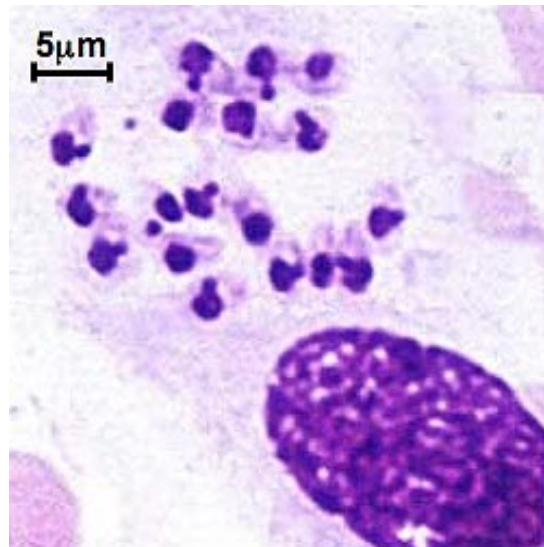
A) Forma promastigota



fonte:

<http://www.susanamendez.com/LeishmaniaFacts/Images/promastigote.jpg>

B) Forma amastigota



fonte:

<http://parasito.montpellier-wired.com/proto/leishmania3.jpg>

Figura 1: Formas dos parasitas do gênero *Leishmania*. A) Parasitas na forma promastigota, flagelada, alongada e presente no sistema digestivo do inseto hospedeiro. B) Diversos parasitas no quadrante esquerdo superior na forma amastigota, aflagelada, arredondada, presente no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado. A estrutura de forma ovalada no quadrante direito inferior corresponde ao núcleo da célula hospedeira.

1.1.1. Ciclo de vida do parasita

O ciclo de vida do parasita é digenético, passando por uma fase promastigota extracelular encontrada no aparelho digestivo de insetos hematófagos dos gêneros *Lutzomyia* no novo mundo ou *Phlebotomus* no velho mundo. A transmissão ao hospedeiro mamífero ocorre no momento da picada do mosquito fêmea contaminado com o parasita na forma promastigota metacíclico. No momento do repasto sanguíneo, esta forma parasitária é inoculada na corrente sanguínea e é fagocitada por células do sistema monocítico fagocitário, como macrófagos. Uma vez no vacúolo digestivo destas células, os parasitas se modificam morfológicamente para a forma amastigota. Esta forma é caracterizada pela ausência de flagelo, e é exclusivamente intracelular sendo encontrada somente no hospedeiro mamífero. Estes amastigotas se dividem por bipartição até o

momento em que ocorre a lise da célula hospedeira. Neste instante os amastigotas caem na corrente sanguínea e são novamente fagocitados por novas células do sistema monocítico fagocitário do hospedeiro. De acordo com a espécie de *Leishmania* haverá afinidade por um determinado tipo de célula do hospedeiro, caracterizando as diferentes formas clínicas da doença. Caso um inseto sadio do gênero *Lutzomyia* ou *Phlebotomus* realize um repasto sanguíneo neste paciente infectado, poderá ingerir formas amastigotas. Ao chegarem ao intestino do inseto, o parasita novamente se diferencia em promastigota, podendo novamente infectar um novo hospedeiro mamífero no momento de um novo repasto (Neves et al., 2000, Rey, 2001). A Fig. 2 apresenta de forma esquemática o ciclo de vida do parasita.

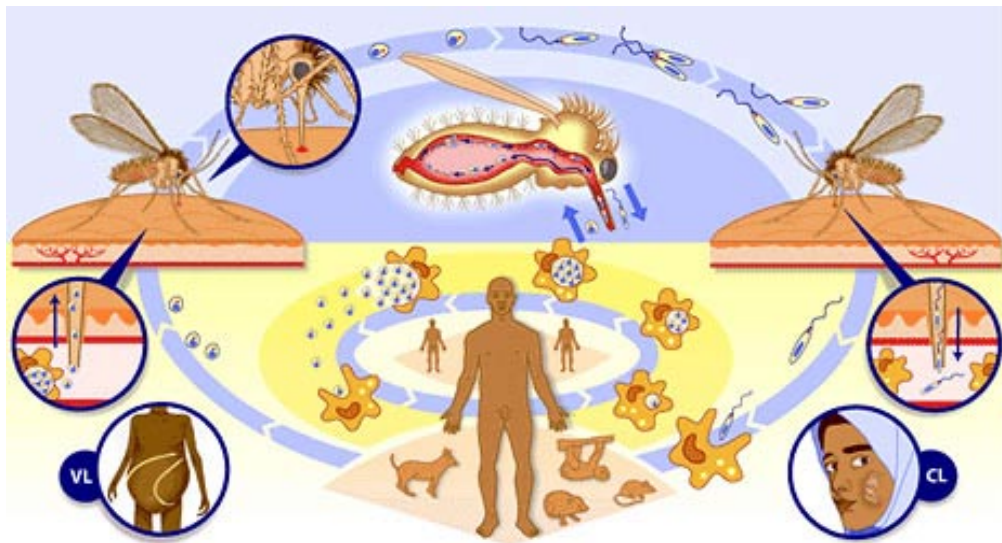


Figura 2: Ilustração do ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania*. A metade superior da figura com fundo azul apresenta a fase do ciclo onde o parasita tem o inseto como seu hospedeiro. A metade inferior da figura com fundo amarelo apresenta a fase do ciclo em que o parasita está no hospedeiro mamífero. Nesta fase do ciclo, de acordo com a espécie do parasita, a leishmaniose pode se apresentar em diferentes formas clínicas como leishmaniose visceral (VL) ou leishmaniose cutânea (CL).

Figura obtida da OMS (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm>)

1.1.2. Classificação taxonômica

As espécies do gênero *Leishmania* pertencem ao Reino Protista, Subreino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophorea, Ordem Kinetoplastida, Subordem Trypanosomatina, Família Trypanosomatidae (Neves et al., 2000, Rey, 2001). A semelhança morfológica entre as espécies, no entanto, faz com que a classificação das espécies do gênero *Leishmania* seja bastante complicada. Métodos bioquímicos e moleculares são ferramentas comumente utilizadas para determinação da espécie de *Leishmania*. Alguns destes métodos são a mobilidade eletroforética de isoenzimas (Ebert, 1987), a densidade de flutuação do DNA nuclear e do cinetoplasto (Chance et al., 1974) e a amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de seqüências de kDNA e de mini-exon (Mahboudi et al., 2002, Harris et al., 1998). A técnica de PCR para amplificação de seqüência de mini-exon com análise subsequente do polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição de DNA ("Restriction Fragment Length Polymorphism": RFLP) também já foi utilizada para determinação da espécie de *Leishmania* (Serin et al., 2007). Atualmente é aceita a classificação das espécies que parasitam o homem em dois subgêneros (Neves et al., 2000).

1) **Subgênero *Leishmania***: inclui parasitas encontrados no Velho e Novo Mundo e agrupa as espécies pertencentes aos seguintes complexos:

- ***Leishmania donovani***: *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) chagasi*.
- ***Leishmania mexicana***: *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (L.) enriettii* (exclusiva de animais), *L. (L.) aristidesi*.
- ***Leishmania hertigi*** (exclusiva de animais): *L. (L.) hertigi*, *L. (L.) deanei*.

O subgênero *Leishmania* inclui também outras espécies que ainda não foram agrupadas em complexos, como: *L. (L.) tropica*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) major* e *L. (L.) pifanoi*.

2) **Subgênero *Viannia***: parasitas encontrados na América tropical e subtropical. Inclui o complexo:

- ***Leishmania braziliensis***: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) colombiensis*.

1.2. A leishmaniose

As leishmanioses eram consideradas zoonoses de transmissão essencialmente silvestre em ambientes rurais. Hoje, no entanto, apresenta mudanças no padrão de transmissão devido a modificações sócio-ambientais, como o desmatamento e o processo migratório caracterizado pelo êxodo rural, levando o homem para as periferias das grandes cidades (dados publicados pelo Ministério da Saúde em 2004).

A dinâmica das leishmanioses varia de acordo com os locais de ocorrência e em função das variáveis relacionadas aos parasitos, aos vetores, aos ecossistemas e à características imunológicas dos hospedeiros. (Neves et al., 2000, Rey, 2001)

1.2.1. Classificação clínica

A leishmaniose é uma parasitose de mamíferos e causa no homem uma doença espectral, pois pode se manifestar sob formas clínicas variadas de acordo com a interação entre a resposta imune do hospedeiro e a virulência, o tropismo e a patogenicidade deste parasita. A OMS (www.who.int/health_topics/leishmaniasis/) classifica as leishmanioses em quatro formas clínicas principais (Neves et al., 2000, Rey, 2001), ilustradas na figura 3:

- **Leishmaniose visceral (LV):** forma mais grave da doença na qual os parasitas apresentam tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear do baço, do fígado, da medula óssea e dos tecidos linfóides.
- **Leishmaniose cutânea (LC):** nesta forma os pacientes apresentam exclusivamente lesões cutâneas, limitadas, podendo ser estas ulceradas ou não.
- **Leishmaniose mucocutânea (LMC):** também conhecida com úlcera de Bauru, são as formas da doença em que os parasitas apresentam afinidade por áreas descobertas da pele e freqüentes complicações nas mucosas da boca, nariz e faringe.
- **Leishmaniose cutânea difusa (LCD):** se caracteriza pela presença de lesões disseminadas em pacientes com resposta imunitária ineficiente. Pode também ocorrer tardiamente em pacientes que tiveram leishmaniose visceral e se trataram.



Figura 3: Diferentes formas clínicas da leishmaniose. À esquerda um exemplo de paciente com leishmaniose do tipo tegumentar, que pode incluir as formas cutânea (LC) e cutânea difusa (LCD). Ao centro uma criança com leishmaniose mucocutânea (LMC). À direita um caso de leishmaniose com tropismo visceral (LV).

Figuras obtidas em www.images.google.com (autoria desconhecida)

A Leishmaniose tegumentar americana (LTA) inclui as formas cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e cutânea difusa (LCD). No Brasil caracterizam-se pela diversidade das apresentações clínicas e das espécies causadoras da doença. Tem sido descrito no país o acometimento tegumentar por seis espécies de *Leishmania*, algumas das quais causam síndromes peculiares associadas a fenômenos imunopatogênicos específicos, como, por exemplo, a forma difusa causada por *L. (L.) amazonensis* e a forma mucosa causada por *L. (V.) braziliensis*. A leishmaniose visceral (LV) é causada no Brasil essencialmente por uma única espécie, a *L. (L.) chagasi* (Neves et al., 2000, Rey, 2001).

1.2.2. Distribuição geográfica e epidemiologia

No mundo, 12 a 15 milhões de indivíduos encontram-se infectados por alguma espécie do gênero *Leishmania*, e estima-se que 350 milhões de pessoas estão sob risco de infecção por habitarem regiões endêmicas, sendo registrados cerca de dois milhões de novos casos por ano (WHO Expert Committee, 1990). Um problema grave de saúde pública é o caso de co-infecção com o vírus HIV (Cruz et al., 2006). Nesta situação onde o paciente se encontra

imunodeprimido, a manifestação da leishmaniose se dá de forma muito mais agressiva e grave (Piscopo & Mallia, 2006). A Fig. 4 ilustra a distribuição da leishmaniose pelo mundo, com destaque para as regiões onde a co-infecção com o vírus HIV tem sido mais alarmante. A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a leishmaniose como doença de categoria I onde se enquadram doenças emergentes e ainda não controladas como a dengue e as tripanossomíases africanas (mais informações estão disponíveis em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/strategy.htm>). Desta forma, a OMS vem incentivando estudos em busca da descoberta de novos alvos parasita-específicos para o desenvolvimento de vacinas e drogas para a erradicação da doença.

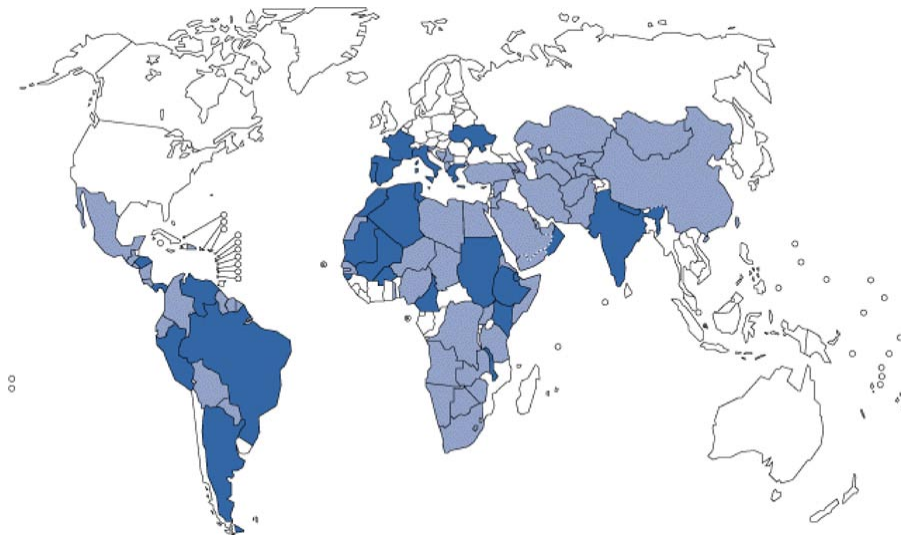


Figura 4: Distribuição dos casos de leishmaniose no mundo. De azul claro estão assinalados os países considerados regiões endêmicas por apresentarem co-existência do parasita e do inseto vetor. Em azul escuro estão assinalados os países que vêm enfrentando um grave problema de co-infecção da leishmaniose com o vírus HIV com manifestação dos sintomas da AIDS.

Figura obtida da OMS

No período de 1982 a 2002, casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Brasil apresentaram coeficientes de detecção crescentes, que oscilaram entre 4,75 e 22,94

peessoas infectadas por cada 100.000 habitantes. Observa-se ainda, uma expansão geográfica visto que, em 1982, foram registrados casos em 22 estados e, em 2002, todas as unidades federativas do país apresentaram autoctonia da doença (dados publicados pelo Ministério da Saúde em 2004).

A leishmaniose visceral (LV) atinge atualmente 19 unidades federativas, principalmente na região Nordeste, onde se concentram 87% dos casos. Nos últimos anos, a doença vem se expandindo para regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste brasileiras. No mesmo período de 1982 a 2002, os coeficientes de incidência de LV variaram de 0,96 a 2,66 casos por cada 100.000 habitantes (dados publicados pelo Ministério da Saúde em 2004).

Os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam também a periurbanização e a urbanização da LV, destacando os surtos ocorridos em cidades como Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e, mais recentemente, as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (dados publicados pelo Ministério da Saúde em 2004). Os agentes etiológicos mais importantes da LTA no Brasil são *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) brasiliensis*.

O parasita alvo do presente estudo é a *L. (L.) amazonensis*, agente causal da leishmaniose cutânea e cutânea-difusa no Brasil, encontrado por toda bacia amazônica, além de estados como Maranhão, Ceará, Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo (Neves et al., 2000).

1.2.3. Diagnóstico

Vários métodos podem ser aplicados para o diagnóstico das leishmanioses, sendo fundamental associar as informações clínicas e epidemiológicas aos resultados de laboratório. No diagnóstico de leishmaniose tegumentar são utilizados os procedimentos de escarificação, punção aspirativa ou biópsia das lesões cutâneas, de linfonodos ou de mucosas. Para leishmaniose visceral recomenda-se o aspirado de medula óssea ou a obtenção do creme leucocitário do sangue periférico. Pode ser realizada biópsia ou punção de órgãos do sistema fagocítico-mononuclear (baço, fígado, linfonodos) (dados do Ministério da Saúde em 2004).

O exame direto consiste na visualização das formas amastigotas do parasito em material obtido das lesões ou tecidos afetados. Constitui-se o exame de primeira escolha por ser mais rápido, de menor custo e de fácil execução. O mesmo material coletado para a realização do exame direto pode ser utilizado em exames parasitológicos indiretos, como a inoculação em meios de cultura ou em animais de laboratório (Piscopo & Mallia, 2006).

Em caso de impossibilidade de isolamento do parasito, é possível realizar o diagnóstico molecular utilizando DNA extraído do material coletado do paciente: fragmentos de pele ou mucosa, sangue periférico, aspirado de medula óssea ou órgãos do sistema fagocítico-mononuclear. A metodologia mais empregada é a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), direcionada para a amplificação de regiões do DNA do cinetoplasto, que permite o diagnóstico e a identificação do subgênero do parasito (Piscopo & Mallia, 2006).

Métodos de imunodiagnóstico também são utilizados. A reação intradérmica de Montenegro é uma reação de sensibilidade tardia, e tem como finalidade avaliar a resposta celular do paciente. A técnica mais utilizada na rotina para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* é a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). A sensibilidade da reação em LV varia de 80 a 95%; porém, em pacientes co-infectados com o vírus HIV, varia de 50 a 60%. O ensaio imunoenzimático (ELISA) também pode ser usado para a pesquisa de anticorpos, apesar de não estar disponível nos laboratórios centrais de saúde pública (dados do Ministério da Saúde em 2004).

1.2.4. Tratamento

Os antimoniais pentavalentes são recomendados como as drogas de escolha. As alternativas disponíveis na rede pública para o tratamento das leishmanioses são a anfotericina B e o isotionato de pentamidina (dados do Ministério da Saúde em 2004). Em decorrência da toxicidade das drogas utilizadas, recomendam-se as avaliações eletrocardiográfica, hepática, pancreática e renal, antes de se instituir a terapêutica (Kedzierski et al., 2006). A Anfotericina B é a droga de segunda escolha para o tratamento das leishmanioses (dados do Ministério da Saúde em 2004). Outra alternativa é o isotionato de pentamidina, que é administrado lentamente em infusão contínua. O uso intravenoso lento pode evitar o aparecimento dos eventos adversos

agudos, como hipotensão, náusea, vômitos e síncope. Formulações lipídicas da anfotericina B demonstraram eficácia no tratamento de pacientes com LV não-associada ao HIV. Em pacientes com co-infecção *Leishmania*-HIV também evidenciaram utilidade, embora não haja, até o momento, estudos comparativos entre essas drogas e os antimoniais e a anfotericina B convencional. As vantagens dessas medicações devem-se à sua menor toxicidade, comparada com a anfotericina B, e ao tempo de tratamento, que pode ser reduzido. No entanto, o custo elevado e a falta de informação comparativa em relação à anfotericina B convencional na leishmaniose excluem atualmente a possibilidade de uso do medicamento em larga escala em programas de saúde pública (dados do Ministério da Saúde em 2004).

Todos estes medicamentos estão sendo usados há várias décadas, mesmo com os problemas de efeito colateral que apresentam. O fato de serem utilizados há tanto tempo também tem permitido a existência de parasitas resistentes aos compostos. Por estes motivos, a OMS tem incentivado o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento desta parasitose (Kedzierski et al., 2006).

1.2.5. Organização genômica dos parasitas do gênero *Leishmania*

Parasitas do gênero *Leishmania* são eucariotos assexuais e diplóides (Stiles et al., 1999, Johnston et al., 1999). O genoma nuclear de *Leishmania* contém aproximadamente 65 Mb (Ivens et al., 2005, Wirth, 1990, Johnston et al., 1999). Os 8-10 mil genes existentes podem estar presentes em cópias únicas, duplicados ou em múltiplas cópias repeditas em *tandem* (Ivens et al., 2005). Até o momento não foram encontrados íntrons, característicos da organização genômica dos eucariotos superiores (Stiles et al., 1999). As seqüências flanqueadoras (intergênicas) exibem consideráveis divergências, mesmo entre genes intimamente correlacionados (Stiles et al., 1999).

Genes nucleares que codificam as proteínas de *Leishmania*, assim como em outros organismos da ordem Kinetoplastida, são co-transcritos por uma RNA polimerase semelhante à polimerase-II, gerando um RNA policistrônico precursor que é processado por “trans-splicing” para gerar o RNA maduro para tradução (Stiles, 1999, Vanhamme & Pays, 1995).

A composição dos nucleotídeos A:T perfazem 40,3% do genoma de *L. major*, (Ivens et al., 2005 Wirth, 1990; Johnston et al., 1999). Seqüências ricas nestes nucleotídeos são elementos

comuns em organismos eucariotos e aparecem organizadas repetidas em *tandem* ou formando mini ou microsátélites. Em *Leishmania* spp. 30% do genoma é formado por repetições que, usualmente, não são cromossomo-específicas nem compartilhadas por todos os cromossomos (Bastien et al., 1992). Os DNAs micro-sátélites presentes nos cromossomos de muitas espécies deste parasita incluem repetições de 2 a 4 nucleotídeos, sendo a repetição mais comum (CA)_n (Rossi et al., 1994). Espécies do gênero *Leishmania* também podem apresentar material genético adicional em mini-cromossomos multicópias ou DNA circular, que podem aparecer espontaneamente ou em consequência de exposição a condições adversas tais como pressão por drogas ou tentativa de *knock-out* de um gene essencial para o organismo (Beverley, 1991, Segovia, 1994).

Dependendo da espécie podem existir de 32 a 36 cromossomos lineares que variam de tamanho entre 0,35 e 3,0 Mb e a condensação durante o ciclo mitótico não é observável (Wincker et al., 1996, Stiles et al., 1999). Os cromossomos apresentam polimorfismo de número e tamanho entre as diferentes espécies e entre clones de uma mesma espécie. A variação entre os cromossomos homólogos é possivelmente resultado de ampliações/deleções em regiões subteloméricas. Por exemplo, em *L. major*, a diferença de aproximadamente 20 Kb entre os dois homólogos do cromossomo 1 é devido a polimorfismos na região subtelomérica (Myler et al., 2000).

1.3. Telômeros e o controle da estabilidade genômica

Os telômeros são as extremidades físicas dos cromossomos lineares essenciais para manter a integridade genômica e a viabilidade celular, além de garantir a completa replicação do genoma e ainda contribuir para a manutenção da arquitetura nuclear (Blackburn, 2000, Zakian, 1995, de Lange, 2002, Jonsson et al., 2002). São compostos por uma sequência de DNA repetida em *tandem* e associada a proteínas, formando um complexo nucleoprotéico. Uma das fitas do telômero é rica em guanina (G) e forma uma protrusão simples-fita conhecida como “3’ G-overhang” (Klobutcher et al., 1981, Henderson & Blackburn, 1993, McElligott & Wellinger, 1997, Wright et al., 1997, Shore, 2001, Blackburn, 2001). A Figura 5 apresenta, de maneira didática, um telômero de uma célula eucariótica.

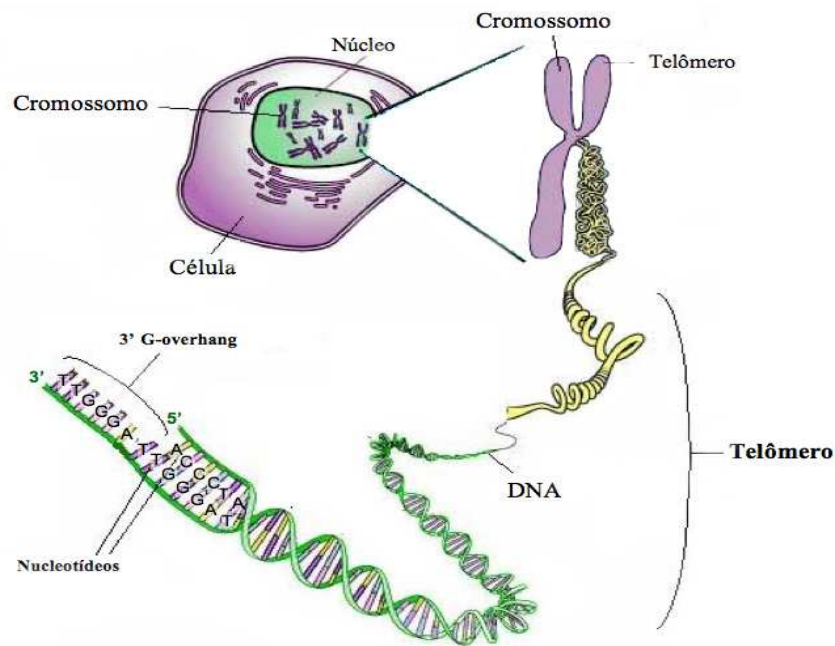


Figura 5: O telômero. Ilustração apresentando uma célula eucariota com o núcleo em destaque em cor verde. Do núcleo, um cromossomo é ampliado e tem em destaque as regiões teloméricas (regiões periféricas). O prolongamento de um telômero do cromossomo é aumentado para ilustrar a composição do DNA telomérico, representado na figura por fitas verdes. Os nucleotídeos que formam o telômero são identificados em sua porção final evidenciando a natureza repetitiva da seqüência telomérica, aqui representada como TTAGGG na fita rica em G. Está também ilustrado o terminal telomérico na forma de simples-fita do DNA, com a protrusão 3' G-overhang.

Fonte: <http://www.chemsoc.org> (modificada)

Este terminal “3’ G-overhang” é conservado desde eucariotos unicelulares até vertebrados (Makarov et al., 1997) e forma estruturas características. Uma destas estruturas é conhecida como *T-loop*, ou loop dos telômeros, e consiste em uma invasão do terminal 3’ da simples-fita telomérica protrusa na dupla-fita telomérica (Griffith et al., 1999, Greider, 2000). A Fig. 6A apresenta um esquema do *T-loop*.

A outra conformação estrutural característica dos telômeros é o G-quadruplex (Simonsson, 2001, Organesian & Brian, 2007). Esta estrutura é formada por interações entre guaninas de uma simples-fita rica em G, como é o caso do terminal telomérico. Estas guaninas se organizam em grupos de quatro formando um plano quadrangular. No caso dos humanos, por exemplo, a repetição telomérica contém 3 guaninas em sequência (TTAGGG) havendo então sobreposição de 3 planos quadrangulares formando uma estrutura de prisma quadrangular (Simonsson, 2001). A Fig. 6B ilustra a estrutura de G-quadruplex no terminal telomérico. Estas estruturas têm como principal função proteger o terminal simples-fita dos telômeros contra a maquinaria de reparo, que poderia reconhecer o terminal cromossômico como uma quebra de DNA por estar na forma de simples-fita (Wei & Price, 2003, Organesian & Brian, 2007, Greider, 2000). Um modelo de combinação das duas estruturas está representado na Fig. 6C.

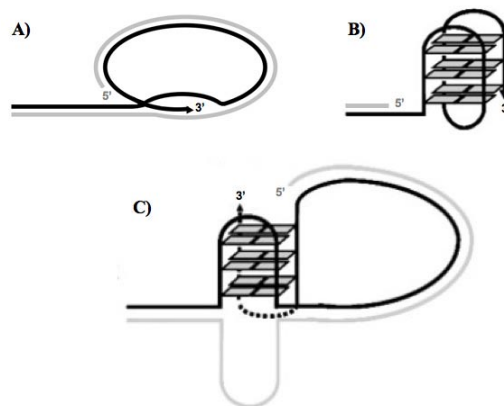


Figura 6: Representação esquemática das estruturas dos terminais teloméricos.

Em A) está representado o T-loop, demonstrando o terminal 3' simples-fita invadindo a dupla-fita formando uma estrutura de loop. Em B) está representada a estrutura de G-quadruplex formada por 3 quartetos de interação entre guaninas na simples-fita telomérica. C) Figura apresentando um possível modelo de estrutura do terminal telomérico conforme se espera *in vivo*, com formação de T-loop e G-quadruplex. As orientações das terminações 5' e 3' estão indicadas nos esquemas.

Figura adaptada de Organesian & Brian, 2007.

1.3.1. Manutenção dos telômeros pela telomerase

A replicação do DNA cromossomal é realizada pela enzima DNA polimerase sempre no sentido 5' → 3'. Sendo assim, a replicação da fita descontínua se dá pela produção de pequenos fragmentos de DNA que vão formando a nova fita complementar. Ao chegar na extremidade de um cromossomo linear, não há espaço para que o RNA iniciador se posicione para replicação do extremo fim do cromossomo. Desta maneira, a cada replicação ocorre uma pequena erosão da extremidade cromossômica na terminação 5', justificando existência de um terminal 3' simples-fita nas extremidades dos cromossomos. Após um número de ciclos de replicação, estas erosões passam a atingir regiões importantes dos cromossomos. Este é conhecido como o “problema da terminação da replicação”, que é solucionado pela enzima telomerase. Ela é capaz de alongar o terminal 3' cromossômico, criando então espaço para que o RNA iniciador possa se posicionar para completar a replicação da fita descontínua (Alberts, 2004).

A telomerase é composta por um componente RNA (TER) e um componente protéico (TERT), similar a uma transcriptase reversa. O componente RNA é utilizado como molde para que ocorra a síntese de repetições teloméricas nos terminais cromossômicos, enquanto o componente protéico possui os domínios catalíticos da enzima (Greider & Blackburn, 1989).

Sabe-se que a perda completa da atividade da telomerase resulta na perda da integridade telomérica, levando a uma redução gradual da sequência telomérica e eventualmente resultando no desaparecimento do DNA telomérico. Nesta situação, existe a possibilidade de que ocorra fusões terminais, defeitos na proliferação celular, parada do crescimento ou até a morte celular. Recentemente, as consequências da perda parcial da função da telomerase têm revelado alguns efeitos no comprimento e na estabilidade dos telômeros (Harrington, 2005). Tanto em camundongos quanto em humanos, a hemizigosidade para o RNA da telomerase ou para o componente TERT leva à incapacidade de manter os telômeros, sendo que em humanos, essa insuficiência pode levar a doenças como a anemia aplástica ou a disqueratose congênita. Assim, a perda parcial da função da telomerase pode resultar em um comprometimento latente, porém mensurável, do comprimento telomérico (Harrington, 2005). Qualquer situação que leve a uma redução no tamanho dos telômeros abaixo de níveis considerados críticos é considerada uma situação de risco para a integridade celular.

1.3.2. Composição do complexo telomérico e organização de suas proteínas

A dinâmica da estrutura telomérica é coordenada por proteínas que participam do complexo nucleoprotéico (Smogorzewska & de Lange, 2004). Em leveduras, um complexo foi denominado telossomo (Dmitriev et al, 2003). Neste complexo, as proteínas RAP1 e CDC13 possuem funções chave para o funcionamento adequado da estrutura. A proteína RAP1 é a principal proteína que se associa ao DNA telomérico dupla-fita (Konig & Rhodes, 1997; Dmitriev et al., 2003). Um dos mecanismos de proteção do telômero é feito através da associação de RAP1 com as proteínas RIF e SIR (Wotton & Shore, 1997; Morse, 2000; Dmitriev et al, 2003). Neste caso, as estruturas de *T-loop* são formadas pela interação de proteínas SIR com histonas em leveduras (Dmitriev et al, 2003). As funções de CDC13 serão detalhadas no item 1.3.3.1. desta tese.

Em humanos um grupo de proteínas exclusivamente teloméricas e interconectadas forma um importante complexo denominado “Shelterina” (Fig. 7, de Lange, 2005). Dentre as principais funções do complexo estão i) a determinação da estrutura telomérica, ii) o controle sobre a regulação do tamanho do telômero e iii) proteção das extremidades cromossômicas evitando que o terminal telomérico seja reconhecido pela maquinaria de reparo como sítio de DNA danificado (de Lange, 2005). As principais proteínas integrantes deste complexo são TRF1, TRF2 e POT1, que interagem diretamente com o DNA telomérico e suas proteínas associadas: TIN2, TPP1 e RAP1. Elas atuam de forma dinâmica e desempenham papéis importantes para manter a estabilidade e o funcionamento das extremidades cromossômicas (de Lange, 2005).

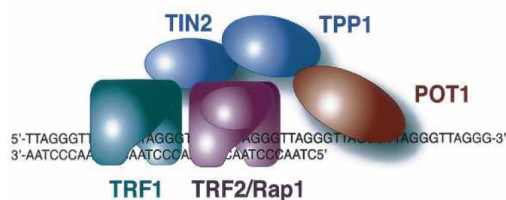


Figura 7: Shelterina. Esquema da rede de interações entre as proteínas teloméricas conhecidas como “Shelterina” que confere estabilidade e determina a dinâmica do terminal cromossômico de humanos. *Fonte: de Lange, 2005*

A proteína humana TRF1 está diretamente relacionada à regulação do tamanho do telômero e ao controle do ciclo celular (van Steensel et al., 1998, Smith & De Lange, 2000, Smogorzewska et al., 2000), enquanto TRF2 protege as extremidades teloméricas contra a maquinaria de reparo (de Lange, 2002, Griffith et al., 1999). A proteína RAP1 de leveduras está envolvida tanto no silenciamento da transcrição quanto na regulação do tamanho dos telômeros (Sussel & Shore, 1991). TIN2 desempenha um papel chave no complexo recrutando TPP1/POT1 para TRF1 e TRF2, além de ser responsável por estabelecer a interação direta entre TRF1 e TRF2, contribuindo para a estabilização de TRF2 nos telômeros (Liu et al., 2004, Ye et al., 2004, de Lange, 2005). POT1 interage exclusivamente com DNA na forma de simples-fita e desempenha além de outras funções, o importante papel de proteger a simples-fita telomérica contra degradação, impedindo fisicamente o acesso de proteínas da maquinaria de reparo (Yang et al., 2005, Liu et al., 2004, de Lange, 2005). Recentemente foi evidenciada a importância de POT1 no processo de recrutamento da telomerase através de sua interação com TPP1 (Xin et al., 2007, Wang et al., 2007). Foi também demonstrado que o complexo POT1-TPP1 aumenta a processividade da enzima telomerase durante a replicação dos telômeros (Wang et al., 2007).

1.3.3. Proteínas que interagem com a simples-fita telomérica rica em G

A protrusão simples-fita telomérica é uma região susceptível a fusões terminais e pode ainda ser reconhecida pela maquinaria de reparo como sendo uma quebra no DNA. Por estas razões, esta protrusão simples-fita deve ser permanentemente protegida, e esta é a função prioritária de uma família protéica denominada TEP (*telomere end proteins*) (Croy & Wuttke, 2006), que interage diretamente com a simples-fita telomérica. Fatores que interferem na função das proteínas TEP podem resultar em desestabilização do cromossomo, perda do DNA telomérico, aumento no número de fusões terminais cromossômicas, ativação de vias de reparo de DNA e conseqüente gerar um quadro de senescência celular (Baumann & Cech, 2001, Hockemeyer et al., 2005, Paeschke et al., 2005, Loayza & de Lange, 2003, Garvik et al., 1995, Shakirov et al., 2005, Yang et al., 2005). Outras alterações nas atividades de proteínas da família TEP podem ainda levar a grandes modificações no tamanho dos telômeros, definindo uma

segunda função: a regulação da atividade da telomerase (Loayza & de Lange, 2003, Shakirov et al., 2005, Colgin et al., 2003, Evans & Lundblad, 1999, Lei et al., 2005). Além disto, proteínas TEP participam ainda de outras funções importantes com impacto na estabilidade cromossomal, incluindo (i) a coordenação de síntese da fita “lagging” (3' → 5') (Chandra et al., 2001), (ii) a determinação do terminal da fita “lagging” (Hockemeyer et al., 2005) e (iii) a regulação da estrutura G-quadruplex nos terminais teloméricos (Paeschke et al., 2005, Fang & Cech, 1993, Zaug et al., 2005).

A grande característica comum a todas as proteínas membro da família TEP é a presença de um domínio de ligação ao DNAsf: o OB-fold (*Oligonucleotide-oligosaccharide-binding*) (Croy & Wuttke, 2006). Este domínio é estruturalmente conservado na escala evolutiva, mas é muitas vezes de difícil reconhecimento, já que as diferentes seqüências de aminoácidos que o compõem não apresentam quase nenhuma conservação (Wei & Price, 2003). A Fig. 8 apresenta um modelo da superfície de contato do domínio OB-fold com o DNAsf.

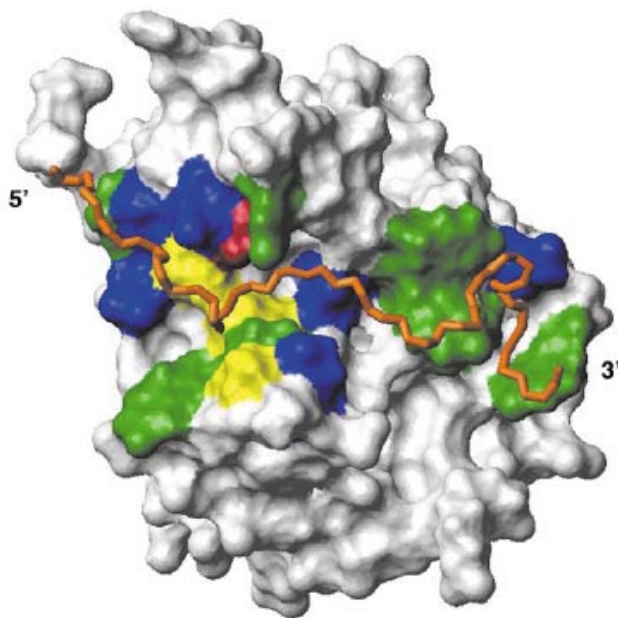


Figura 8: Estrutura do domínio OB-fold da proteína CDC13. O modelo apresenta a superfície de contato do domínio OB-fold da proteína CDC13, membro da família TEP, onde a fita simples de DNA está representada em cor laranja tendo seus terminais 5' e 3' indicados. As regiões da proteína que fazem contato com o DNA estão marcadas com as cores: verde (representando resíduos de aminoácidos aromáticos), azul (resíduos básicos), amarelo (resíduos alifáticos) e vermelho (resíduos polares).

Fonte: Mitton-Fry et al., 2004

Segue abaixo uma breve descrição sobre os principais membros da família TEP: as proteínas CDC13 de *S. cerevisiae*, a POT1 de humanos e *S. pombe*, e a TEBP de *O. nova*.

1.3.3.1. CDC13 de *Saccharomyces cerevisiae*

A CDC13 é a proteína responsável pela proteção da simples-fita telomérica de *S. cerevisiae* (Nugent et al, 1996, Anderson et al., 2002, Lin & Zakian, 1996). O domínio de ligação ao DNA na forma de simples-fita, denominado CDC13-DBD, apresenta ~ 23 kDa e está localizado na região central da proteína. Análises computacionais predisseram a existência de

múltiplos domínios OB-fold em CDC13 (Theobald & Wuttke, 2004), mas estes dados não foram confirmados experimentalmente. Um recente experimento demonstrou que o mutante truncado de CDC13 contendo apenas o domínio de ligação ao DNA se liga ~ 100 vezes mais fortemente ao DNAsf do que a proteína CDC13 em sua forma integral (Anderson et al., 2002). A importância de CDC13 na manutenção dos telômeros foi comprovada por mutantes não funcionais para esta proteína, que resultaram em perda gradual do telômero, acarretando em um fenótipo letal conhecido como senescência replicativa (Evans & Lundblad 1999, Pennock et al., 2001, Taggart et al., 2002). Algumas destas mutações resultaram em rápida erosão da fita rica em “C” do cromossomo, ocasionando uma posterior interrupção do ciclo celular (Garvik et al., 1995, Booth et al., 2001), demonstrando assim envolvimento em funções regulatórias que governam a síntese e a atividade de nuclease durante a replicação da fita rica em C do DNA telomérico (Chandra et al, 2001). Isto implica que a proteína atua na proteção não somente do DNAsf, mas também do DNA telomérico como um todo.

Além de proteger, a proteína CDC13 tem também funções de regulação dos telômeros. Atuando como regulador positivo da elongação telomérica a CDC13 recruta a telomerase ao terminal cromossômico (Evans & Lundblad, 1999, Bianchi et al., 2004, Taggart et al., 2002, Smogorzewska & De Lange, 2004). Quando a proteína CDC13 foi expressa em fusão com Est1, foi capaz de restaurar o alongamento dos telômeros em leveduras mutantes para a proteína RPA que haviam perdido a capacidade de manutenção das extremidades teloméricas (Schramke et al., 2004). Este resultado sugere que deve haver um mecanismo sinérgico entre RPA e CDC13 no recrutamento da telomerase via Est1 (Schramke et al., 2004). CDC13 pode ainda impedir o acesso da telomerase ao terminal telomérico por um mecanismo ainda pouco conhecido (Chandra et al, 2001), atuando como reguladora negativa da elongação telomérica.

Além da função nos telômeros, a proteína CDC13 tem também um papel na replicação do DNA (Bianchi & Shore, 2007). Existem evidências de que um complexo protéico que inclui a CDC13 se associa com a subunidade catalítica da DNA Polimerase- α , sugerindo que a maquinaria de replicação telomérica atua concomitantemente com a maquinaria de replicação do DNA (Gottschling & Zakian, 1986, Qi & Zakian, 2000).

Resultados recentes mostraram que *S. cerevisiae* possui ainda duas proteínas - Stn1 e Ten1 – que interagem com CDC13 e são importantes na regulação do tamanho dos telômeros. Estas proteínas apresentam similaridade com duas subunidades da proteína RPA (RPA-2 e RPA-3), que será discutida mais adiante nos tópicos 1.4.1.1 e 1.4.1.2. Desta forma especula-se que o complexo CDC13/Stn1/Ten1 em *S. cerevisiae* desempenhe função análoga à proteína RPA com suas 3 subunidades, nos telômeros de levedura (Gao et al., 2007).

A Fig. 9 apresenta um esquema da localização do domínio OB-fold na estrutura primária de CDC13 segundo busca no banco de dados CDD (*Conserved Domain Database*).

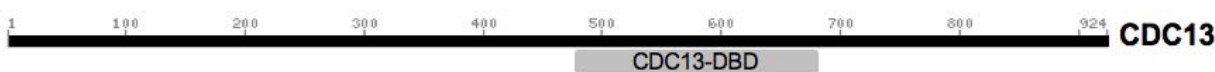


Figura 9: CDC13. Esquema de localização dos domínios OB fold em CDC13 de acordo com análise por CD-Search (Marchler-Bauer & Bryant, 2004)

1.3.3.2. POT1 de humanos e *Schizosaccharomyces pombe*

A proteína POT1 é o principal elemento de proteção das extremidades cromossômicas dos eucariotos superiores, já tendo sido caracterizada em diversos organismos incluindo leveduras de fissão (Baumann & Cech, 2001), humanos (Baumann & Cech, 2001), galináceos (Wei & Price, 2004) e, mais recentemente, *Arabidopsis thaliana* (Shakirov et al., 2005). A POT1 humana (hPOT1) apresenta dois domínios OB-fold de interação ao DNA (Lei et al., 2004), enquanto a POT1 de *S. pombe* (SpPOT1) apresenta apenas 1 domínio OB-fold (Baumann & Cech, 2001). Em hPOT1 foi demonstrado que o domínio OB-fold N-terminal (OB1, Figura 10) se liga a 6 nucleotídeos, assim como o OB-fold de SpPOT1, enquanto o segundo OB-fold (OB2, Figura 10) se liga ao terminal 3' livre dos DNAsf (Lei et al., 2004).

POT1, assim como outros membros da família TEP, apresenta um papel na proteção dos telômeros. Experimentos de “knock-down” resultaram em telômeros de tamanho alterado e foi ainda observado um aumento do número de células senescentes (Veldman et al., 2004, Hockemeyer et al., 2005, Loayza & de Lange, 2003, Yang et al, 2005, Colgin et al., 2003). Resultados recentes demonstraram que a proteína hPOT1 é capaz de desfavorecer a formação da

estrutura G-quadruplex nos terminais teloméricos *in vitro* de forma semelhante a TEBP- $\alpha\beta$ (Zaug et al., 2005). Esta atividade ainda não foi comprovada *in vivo*. hPOT1 ainda regula a atividade de nuclease na fita telomérica rica em “C”. Por esta razão, a proteína hPOT1 é responsável por definir a terminação 5’ da fita telomérica rica em “C”: ATC-5’ (Hockemeyer et al., 2005). Dados recentes sugerem ainda que POT1 tem um papel importante na regulação do tamanho dos telômeros, sendo que através de sua interação com TPP1, é capaz de recrutar a telomerase para o terminal telomérico aumentando a processividade do complexo (Xin et al., 2007, Wang et al., 2007).

SpPOT1 tem sido usada como um paradigma para prever a função de outros membros da família TEP, já que o “knock-out” do gene *SpPOT1* ocasiona severos problemas no desenvolvimento da célula e encurtamento de telômeros, o que sugere que *SpPOT1* é essencial para uma proliferação celular normal e para uma proteção adequada dos terminais teloméricos. Além desta função de proteção, *SpPOT1* também está implicada na regulação do tamanho dos telômeros (Bunch et al., 2005).

A Fig. 10 ilustra a localização dos domínios OB-fold na estrutura primária de hPOT1 segundo busca no banco de dados CDD (*Conserved Domain Database*) (Lei et al., 2004).



Figura 10: POT1. Esquema de localização dos domínios OB fold em hPOT1 de acordo com análise por CD-Search (Marchler-Bauer & Bryant, 2004).

1.3.3.3. TEBP de *Oxytricha nova*

A TEBP, que foi a primeira proteína identificada como ligante da extremidade telomérica na forma de DNAsf, contém 2 subunidades básicas (α e β) (Price & Cech, 1987, Gottschling & Zakian, 1986, Price & Cech, 1989, Fang & Cech, 1993). De maneira curiosa, a subunidade β demonstra fraca afinidade pelo DNA simples-fita (Fang et al., 1993, Gray et al., 1991). Por outro lado, modula a interação da subunidade α com o DNA, formando um complexo heterodimérico: TEBP- $\alpha\beta$ (Gray et al., 1991, Fang & Cech 1993 Raghuraman, et al., 1989).

A estrutura de TEBP- $\alpha\beta$ com a subunidade β incompleta (sem os resíduos de 1 a 260) revelou um total de 4 domínios OB-fold, 3 dos quais (2 em α e 1 em β) formam o DBD, enquanto o domínio OB-fold na porção C-terminal de TEBP- α comporta-se como um domínio de dimerização para β (Horvath et al., 1998, Horvath & Schultz, 2001).

Ambas subunidades de TEBP são necessárias para a proliferação celular porque o silenciamento de algum dos genes tem como consequência a morte celular (Paeschke et al., 2005). TEBP- $\alpha\beta$ protege o DNAsf telomérico de modificações químicas e também contra o ataque de nucleases (Price & Cech, 1987, Gottschling & Zakian, 1986) e regulam a atividade de telomerase, presumivelmente, pela exclusão do terminal 3' dos telômeros (Froelich-Ammon et al., 1998). Os terminais simples-fita presente nos telômeros de *O. nova* formam uma estrutura de G-quadruplex e o complexo TEBP- $\alpha\beta$ é capaz de regular sua formação (Paeschke et al., 2005, Fang & Cech, 1993). Os papéis funcionais de TEBP- α_2 são bem menos conhecidos. No entanto, este dímero também protege a simples-fita telomérica contra modificações químicas, apesar de ser com um padrão diferente daquele observado com TEBP- $\alpha\beta$ (Gray et al., 1991). Foi proposto que TEBP- α_2 participe da formação de grupamentos altamente ordenados de DNAsf que lembram estrutura de flores (rosetas) *in vivo* (Peersen et al., 2002, Jönsson et al., 2002, Murti & Prescott, 2002, Prescott, 1994).

Recentemente, foi demonstrado que a proteína TPP1 de mamíferos é homóloga a TEBP- β . O complexo TPP1-POT1 aumenta a afinidade de POT1 pelo DNAsf. Há evidências ainda de que TPP1 se associa à telomerase através de um suposto domínio OB-fold nesta proteína, determinando assim um elo de ligação entre o complexo Shelterina e a enzima telomerase.

Os domínios OB-fold na estrutura primária de TEBP- α estão ilustrados na Fig. 11 segundo busca no banco de dados CDD (*Conserved Domain Database*).

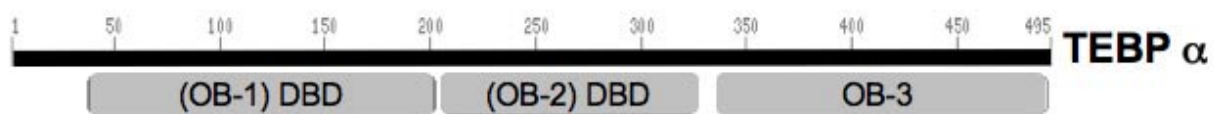


Figura 11: TEBP α . Esquema de localização dos domínios OB fold em TEBP- α de acordo com análise por CD-Search (Marchler-Bauer & Bryant, 2004).

1.4. Os telômeros de protozoários tripanosomatídeos

Os telômeros de Kinetoplastida, assim como os de outros eucariotos, são compostos pela repetição em *tandem* da sequência 5'-TTAGGG-3', sugerindo mecanismos comuns básicos para a manutenção dessas estruturas (Cano, 2001). A estrutura T-loop também já foi identificada em tripanosomatídeos (Munoz-Jordan et al, 2001).

No entanto, por se tratar de um grupo divergente (dos demais eucariotos) na escala evolutiva (Simpson et al., 2004) é natural que existam particularidades na estrutura dos telômeros dos tripanosomatídeos. Os telômeros de *T. brucei*, por exemplo, possuem um crescimento aparentemente não controlado e são capazes de se manter estáveis na ausência da telomerase (Dreesen & Cross, 2006). Existem ainda genes que codificam glicoproteínas de superfície (VSGs) que apresentam localização sub-telomérica e têm sua transcrição regulada pelos telômeros em um mecanismo bastante estudado mas ainda pouco entendido (Vanhamme et al., 2001, Navarro et al., 2007).

Particularmente no gênero *Leishmania*, evidências indicam que a estrutura e a manutenção dos terminais cromossômicos são similares aos encontrados nos telômeros da maioria dos eucariotos (Stiles et al., 1999, Cano, 2001, Lira et al., 2007b). A via de elongação dos telômeros é provavelmente telomerase dependente, visto que esta enzima já foi identificada em espécies do gênero e sua atividade também já foi verificada (Cano et al., 1999, Giardini et al., 2005). A sequência telomérica repetitiva em *Leishmania* é a mesma encontrada em diversos eucariotos superiores: 5'-TTAGGG-3'. Algumas características particulares dos telômeros deste gênero incluem a região sub-telomérica, que pode apresentar divergências até mesmo entre espécies do gênero. É nesta região que existem as LCTAS (*Leishmania conserved telomeric associated sequences*), que são sequências compostas por blocos conservados. Em *L. brasiliensis* existe aparentemente um único bloco de LCTAS por terminal telomérico. Já em *L. major* as LCTAS encontram-se repetidas em *tandem* e intercaladas pela sequência telomérica (Fu & Barker, 1998). *L. amazonensis* possui as LCTAS distribuídas de maneira similar à encontrada em *L. major* (Conte & Cano, 2005). Existem ainda polimorfismos intercromossômicos em relação ao número de blocos de LCTAS existentes nos telômeros de *L. amazonensis* (Conte & Cano, 2001). O número de repetições teloméricas que determinará o tamanho dos telômeros também é

bastante polimórfico nesta espécie (Conte & Cano, 2005). Análise dos fragmentos de restrição terminal (TRF) demonstrou que os telômeros podem variar em tamanho de 0,2 a 2,0 Kb, e diferentes cromossomos podem apresentar diferentes tamanhos o que sugere um mecanismo de regulação que atua em nível cromossômico (Conte & Cano, 2005).

O complexo protéico que compõe a cromatina telomérica em *L. amazonensis* está começando a ser determinado. Em nosso laboratório, duas proteínas foram identificadas por afinidade à simples-fita telomérica rica em “G” de *L. amazonensis* utilizando-se métodos bioquímicos. São elas as proteínas LaRBP38 (AY485300) e LaRPA-1 (AY493356), componentes dos complexos teloméricos LaGT2 e LaGT3, respectivamente (Fernández et al., 2004), objetos de estudo desta tese. Também já foram identificadas proteínas que se associam à dupla-fita telomérica desta espécie, como a LaTBP1 (Lira et al., submetido), um homólogo de TRF2 (Silva et al., dados não publicados) e novamente a proteína LaRBP38, que pode estar presente ao longo de todo o telômero. A enzima telomerase também já foi caracterizada e como já mencionado, deve ser a responsável pela elongação dos terminais cromossômicos. A Fig. 12 mostra o panorama atual dos telômeros de *Leishmania*.

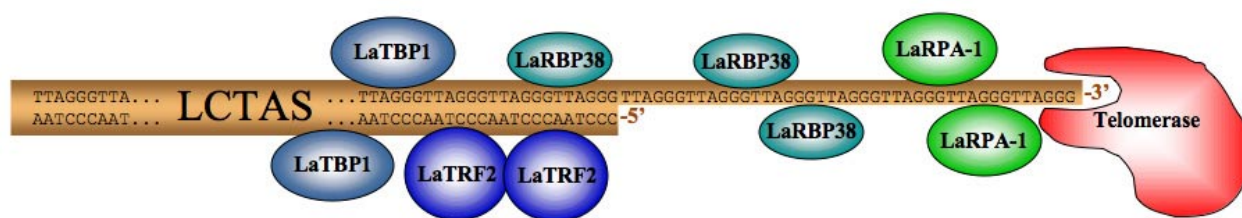


Figura 12: Panorama atual dos telômeros de *Leishmania*. Em marrom está representado o DNA telomérico, composto por uma porção dupla-fita, formado pela repetição TTAGGG em *tandem* e contendo seqüências conservadas associadas ao telômero (LCTAS). As formas ovais coloridas representam as proteínas já identificadas interagindo com o DNA telomérico: LaTBP1, LaTRF2, LaRBP38, LaRPA-1 e telomerase.

1.4.1 Proteínas que interagem com a simples-fita telomérica de *L. amazonensis*

Um estudo bioquímico realizado a partir de extrato de proteínas nucleares de *L. amazonensis* mostrou a existência de 3 complexos protéicos que se associavam *in vitro* ao DNAsf telomérico desta mesma espécie (Fernández et al., 2004). Um destes complexos não teve ainda seu componente protéico identificado. Os outros 2 complexos tiveram seus componentes protéicos determinados por espectrometria de massa como proteínas homólogas a RPA-1 e RBP38 (Fernández et al., 2004).

O presente trabalho teve então como objetivo caracterizar e confirmar a interação *in vivo* destas proteínas nos terminais teloméricos de *L. amazonensis*.

1.4.1.1. A proteína RPA

A Proteína de Replicação A (RPA) é uma proteína trimérica formada pelas subunidades RPA-1, RPA-2 e RPA-3, inicialmente identificada em um extrato de células HeLa como proteínas fundamentais para a replicação do DNA do vírus simian 40 (SV40) (Wold & Kelly, 1988, Stillman et al., 1992). Em seguida, descobriu-se que se tratava de uma proteína ligante de DNAsf amplamente distribuída e conservada entre os eucariotos. Descobriu-se ainda que a proteína RPA apresenta múltiplas funções no metabolismo do DNA, participando das maquinarias de replicação, reparo, recombinação, “checkpoints”, transcrição e manutenção dos telômeros (Longhese et al., 1994, Wold, 1997, Smith et al., 2000).

Na maquinaria de reparo a proteína RPA sofre hiperfosforilações por cinase-dependentes de DNA como consequência de danos no DNA e estresse replicativo. Estas modificações modulam as funções da proteína, interferindo no modo de interação da mesma com o DNA e com outras proteínas, provavelmente direcionando a proteína para uma via metabólica específica. Estas hiperfosforilações, por serem induzidas por danos no DNA ou estresse replicativo, devem determinar um papel para a RPA em vias de sinalização de “checkpoint” do ciclo celular (Zou et al., 2006). Sabe-se que a proteína RPA participa das 4 grandes vias de reparo do DNA: reparo por excisão do DNA (NER), reparo por excisão de base (BER), reparo por DNA não pareado (MMR) e reparo na quebra da dupla-fita (DSB) (Wold, 1997).

Como o ciclo celular é um processo coordenado, é importante haver proteínas ou complexos com funções múltiplas em diferentes maquinarias metabólicas de modo a regular e sincronizar a dinâmica de funcionamento da célula. A proteína CDC13, anteriormente apresentada, possui funções na maquinaria de replicação e no complexo telomérico. Algumas proteínas já foram também identificadas participando tanto das maquinarias de reparo, sinalização de “checkpoint” por danos no DNA, quanto na maquinaria telomérica (Nakamura et al., 2002). O heterodímero Ku70/Ku80, por exemplo, se associa a quebras no DNA dupla-fita e é necessário em reparo de DNA por junção de terminais não homólogos, além de se associar ao complexo telomérico (Miyoshi et al., 2003, Lewis & Resnick, 2000, Ribes-Zamora et al., 2007). O complexo Rad32/Rad50/Nbs1 está também envolvido no reparo de DNA danificado, no checkpoint de DNA na fase S da divisão celular e também na regulação dos telômeros (Wilson et al., 1999, Chahwan et al., 2003). Um terceiro complexo multifuncional é o complexo Rad3/Rad26, que é necessário no processo de replicação, de “checkpoint” de danos no DNA e também faz parte da maquinaria telomérica (Matsuura et al., 1999, Pandita et al., 2006).

Assim como estes complexos, a proteína RPA além de ter importantes funções nas vias de sinalização de “checkpoint” do ciclo celular, maquinarias recombinação, reparo e replicação do DNA, atua também de forma essencial na manutenção dos telômeros, sendo por tudo isso uma proteína chave para a coordenação do metabolismo de DNA nas células eucarióticas. Para cumprir todas estas funções, foram caracterizados seis domínios OB-fold na proteína RPA que são responsáveis i) pelas interações para formação do trímero, ii) pelas interações com outras proteínas e iii) fundamentalmente pelas interações com o DNAsf (Bochkarev & Bochkareva, 2004). A Fig. 13 traz um esquema das três subunidades formadoras da proteína RPA e mostra a localização dos domínios OB nas três subunidades (Bochkarev & Bochkareva, 2004).

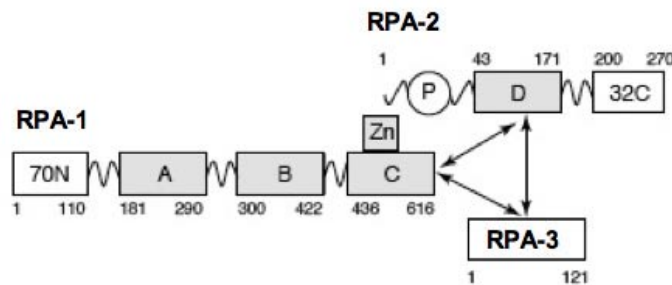


Figura 13: As três subunidades de RPA. A figura mostra de forma esquemática as 3 subunidades da proteína RPA humana ilustrando seus domínios de interação. Os domínios estão representados por retângulos e a numeração mostra a posição dos aminoácidos que delimitam cada domínio. Zn: zinco. P: sítio de fosforilação.

Fonte: Bochkarev & Bochkareva, 2004

A maior subunidade da proteína RPA, é a RPA-1 (ou RPA70, de acordo com seu tamanho em Daltons) e contém 4 domínios OB-fold: RPA1-70N, RPA1-A, RPA1-B e RPA1-C. O domínio RPA1-70N estimula a atividade da DNA polimerase alfa, interage com diversos ativadores de transcrição, incluindo o supressor de tumor p53 e ainda interage com proteínas das maquinarias de “checkpoint” de dano ao DNA durante o ciclo celular (Jacobs et al., 1999). É provável que este seja o principal domínio de interação da RPA com outras proteínas das maquinarias de replicação e reparo. Os domínios OB-fold RPA1-A e RPA1-B são os principais responsáveis pela interação de RPA com o DNAsf (Bochkareva et al., 2001). A Fig. 14 traz uma representação estrutural da interação do domínio RPA1-A com um DNAsf. O domínio OB-fold RPA1-C é necessário na trimerização da proteína RPA além de possuir motivo de ligação ao zinco (Bochkareva et al., 2002). A subunidade RPA-2 (ou RPA32) contém o domínio OB-fold RPA2-D e o domínio RPA2-32C. O domínio RPA2-D é um ligante fraco ao DNAsf e está envolvido na trimerização. É o domínio que contém todos os sítios de fosforilação da proteína RPA, sendo fundamental para a função desta proteína nas maquinarias de recombinação, reparo e sinalização de danos no DNA. O domínio RPA32C está envolvido em várias vias metabólicas do DNA, incluindo replicação, reparo, recombinação e “checkpoint” de danos no DNA. A menor subunidade de RPA é a RPA-3 (ou RPA-14), e contém o domínio de mesmo nome (RPA-3)

ainda pouco estudado, mas acredita-se que tem um papel na conformação estrutural para a formação do trímero de RPA. As informações sobre os domínios da proteína RPA e suas funções podem ser obtidas na revisão de Bochkarev & Bochkareva, 2004 e também no banco de dados de domínios conservados em www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi.

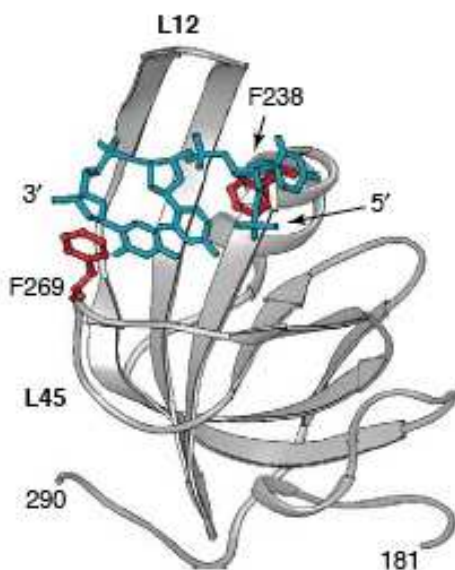


Figura 14: Interação do domínio OB fold da proteína RPA com o DNAsf. Estrutura do domínio RPA DBD-A interagindo com um DNAsf, destacando em vermelho os resíduos importantes para a interação.

Fonte: Bochkarev & Bochkareva, 2004

1.4.1.2. RPA nos telômeros

Conforme já mencionado, a proteína RPA apresenta também funções essenciais na manutenção dos telômeros (Smith & Rothstein, 2000, Dahlén et al., 2003, Schramke et al., 2004). Uma das principais funções é a capacidade de ativar a enzima telomerase (Schramke et al., 2004). Esta habilidade é mediada através da interação com a proteína Est1, que faz parte do complexo da telomerase. Em leveduras foi demonstrado que durante a fase S do ciclo celular, a proteína RPA recruta Est1 para o terminal telomérico, trazendo junto a telomerase que estará apta a alongar a simples-fita telomérica (Schramke et al., 2004). Foi observado que uma mutação

na região N-terminal de RPA-2 de *S. cerevisiae* resultou em uma interação incorreta entre RPA e Est1, e também em rápida erosão dos telômeros. Ao se expressar uma proteína híbrida formada pela fusão de Est-1 com CDC13, a manutenção dos telômeros foi restaurada, sugerindo que RPA e CDC13 devem atuar de maneira sinérgica nos telômeros de *S. cerevisiae* (Schramke et al., 2004).

Outra importante função de RPA nos telômeros está relacionada com a capacidade desta proteína de desfazer a estrutura de G-quadruplex formada *in vitro* a partir da interação entre guanidinas de uma fita simples de DNA rica neste nucleotídeo (Paeschke et al., 2005, Salas et al., 2006). Esta estrutura apesar de nunca ter sido observada *in vivo* por dificuldades técnicas, já foi obtida *in vitro* com seqüências teloméricas em condições que simulam as condições fisiológicas de uma célula, corroborando a hipótese de que a estrutura de G-quadruplex também existe *in vivo*. Outras proteínas teloméricas como POT1 (Zaug et al., 2005) e TEBP (Fang & Cech, 1993) também são capazes de desfazer esta estrutura de maneira semelhante à RPA. Ao se desfazer a estrutura de G-quadruplex, a telomerase passa a ter acesso ao terminal simples-fita telomérico, substrato para sua atividade enzimática de elongação dos telômeros. Desta maneira, a proteína RPA pode atuar de forma a permitir que o telômero possa ser elongado.

Além das funções diretamente relacionadas à manutenção dos telômeros como o recrutamento da telomerase via Est1 e a desestruturação do G-quadruplex permitindo o acesso da telomerase aos terminais cromossômicos simples-fita, a proteína RPA também interfere na regulação dos telômeros através de interações com outras proteínas. Em *S. cerevisiae*, por exemplo, um mutante de RPA-1 quando combinado com um mutante de Ku70 apresentou de forma sinérgica uma severa redução no comprimento dos telômeros (Ono et al., 2003).

A proteína RPA é ainda capaz de estimular a atividade de helicases de WRN (Werner syndrome) e BLM (Bloom syndrome), encontradas em complexos que promovem a denaturação da dupla-fita de DNA em regiões longas de dupla-fita telomérica previamente ligadas à TRF2 *in vivo* (Opresko et al., 2002), sugerindo que todas estas proteínas atuam em uma mesma via nos terminais cromossômicos. Em levedura, um mutante para a proteína homóloga a RPA apresentou um encurtamento gradual de telômeros. Quando esta mutação é combinada com outra no gene que codifica o homólogo de TRF2 neste organismo, a proteína TAZ1, observou-se rápida erosão

das extremidades cromossômicas, fazendo com que os telômeros percam completamente a capacidade de se manterem estáveis (Kibe et al., 2007). Este mesmo fenótipo de instabilidade telomérica com perda abrupta dos telômeros é também observado em mutantes duplos para o gene da POT1. Foi observado ainda que a superexpressão de POT1 no mutante de levedura para os genes de RPA e TAZ1 suprimiu a perda dos telômeros, reestabelecendo a estabilidade telomérica e sugerindo alguma ligação entre o mecanismo de ação de POT1 com as proteínas RPA e TAZ1 (Kibe et al., 2007).

O presente trabalho confirma a associação da proteína LaRPA-1 com os telômeros de *L. amazonensis* (Siqueira Neto et al., 2007). Foi também demonstrado que o domínio responsável pela interação é também um OB-fold (Siqueira Neto et al., 2007), assim como as proteínas da família TEP, o que sugere mecanismos básicos comuns de atuação destas proteínas na simples-fita telomérica dos eucariotos.

Contudo, podemos notar que o papel da RPA no metabolismo do DNA vai além de qualquer função isolada, sendo fundamentalmente coordenar interações específicas de proteínas nucleares mantendo uma dinâmica equilibrada entre as principais maquinarias que envolvem a manutenção genômica (Bae et al., 2001, Zou & Elledge, 2003).

1.4.1.3. A proteína RBP38

A proteína RBP38 foi primeiramente descrita como uma proteína que se associa e estabiliza RNA simples e dupla-fita nas mitocôndrias de parasitas da ordem Kinetoplastida (Sbicego et al., 2003). É uma proteína exclusiva de organismos desta ordem, não existindo aparentemente nenhum homólogo a mesma nos bancos de dados públicos, de outros organismos. Mais recentemente, foi demonstrado que em *T. brucei* esta proteína, denominada de p38, atua na maquinaria de replicação do kDNA, ou seja, o DNA mitocondrial destes parasitas (Liu et al., 2006). Experimentos em *T. brucei* utilizando “knock-down” do gene p38 por RNAi demonstraram que 40 horas após o início da interferência por RNA foi encontrada uma redução de 90% do mRNA da proteína p38. Com a redução de p38 as células cessaram o crescimento após 4 ou 5 dias, apresentando desaparecimento da rede do kDNA (Liu et al., 2006). Estes resultados demonstram a essencialidade desta proteína para a viabilidade do organismo.

Algumas evidências indicam também a existência de uma função nuclear desta proteína. Em *T. cruzi* a proteína RBP38 é capaz de reconhecer especificamente um motivo poli[dT-dG] (Duhagon et al., 2003). Estas regiões ricas em poli-dinucleotídeos são freqüentes no genoma deste parasita (Duhagon et al., 2001) e podem estar envolvidas na regulação da expressão gênica. Em *L. amazonensis* a proteína foi identificada por ensaios *in vitro* como uma proteína que se associa ao DNAsf telomérico (Fernández et al., 2004). Mais recentemente, foi demonstrado por ensaios de imunoprecipitação de cromatina, que em *L. amazonensis* esta proteína interage *in vivo* com o DNAsf telomérico, com kDNA e com seqüências ricas em GT (Lira et al., 2007a). Ensaio de mobilidade em gel mostram ainda que a proteína é capaz de se ligar ao DNA telomérico na forma de simples ou dupla-fita (Fernández et al., 2004, Lira et al., 2007a).

Em conjunto, estes resultados sugerem que a proteína RBP38 pode ter função tanto mitocondrial quanto nuclear e se tornar futuramente um alvo potencial para estudos de desenvolvimento de terapias antiparasitárias.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal caracterizar as proteínas LaRPA-1 e LaRBP38, previamente identificadas no laboratório como proteínas que interagem com a simples-fita rica em G nos telômeros de *L. amazonensis*. Desta forma, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- 1) Clonar e determinar a organização genômica dos genes que codificam as proteínas que interagem com a simples-fita telomérica de *L. amazonensis*.
- 2) Clonar os genes que codificam as proteína LaRPA-1 e LaRBP38 em vetor de expressão bacteriano para obtenção de proteínas recombinantes. Estas proteínas foram utilizadas na realização dos estudos de interação entre proteína e DNA, e também na produção de anticorpos por meio de imunização de coelhos.
- 3) Avaliar a interação *in vivo* das proteínas LaRPA-1 e LaRBP38 com o DNA telomérico em *L. amazonensis* através de imunoprecipitação da cromatina.
- 4) Verificar a localização sub-celular das proteínas LaRPA-1 e LaRBP38 com os telômeros de *L. amazonensis*.

3. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão divididos em 2 partes:

- i) Na forma de um artigo anexado como item 3.1. da tese demonstrando a interação *in vivo* da proteína LaRPA-1 com o DNA simples-fita telomérico de *L. amazonensis* por meio de ensaio de imunoprecipitação de cromatina. A co-localização da proteína LaRPA-1 com os telômeros do parasita foi identificada através da combinação de técnicas de hibridização *in situ* e de imunofluorescência.
- ii) No item 3.3. estão apresentados resultados complementares que incluem:
 - Caracterização dos genes que codificam as proteínas LaRPA-1 e LaRBP38;
 - Confirmação de que LaRBP38 é expressa em *L. amazonensis*;
 - Confirmação de que LaRBP38 se associa *in vivo* ao DNA telomérico de *L. amazonensis*;
 - Determinação da intensidade de interação entre LaRPA-1 e o DNA telomérico;
 - Tentativa de superexpressar as proteínas LaRPA-1 e LaRBP38 em *L. amazonensis*;
 - Determinação da localização subcelular de RPA-1 e RBP38 por imunofluorescência.

No final desta tese no item 6. estão listadas publicações complementares produzidas com participação do autor desta tese durante o seu trabalho de doutorado.

***Leishmania* Replication Protein A-1 binds *in vivo*
single-stranded telomeric DNA**

J.L. Siqueira Neto, C.B.B. Lira, M.A. Giardini, L. Khater, A.M. Perez, L.A. Peroni, J.R.R. dos Reis, L.H. Freitas-Junior, C.H.I. Ramos and M.I.N. Cano*

Resumo:

A proteína de replicação A (RPA) é uma proteína heterotrimérica ligante de DNA simples-fita e altamente conservada, envolvida em diferentes eventos de metabolismo de DNA. Em leveduras, as subunidades 1 (RPA-1) e 2 (RPA-2) atuam também recrutando a telomerase e, em humanos, o complexo auxilia no desenovelamento de estruturas G-quadruplex formadas pela fita telomérica 3' rica em G. Na maioria dos eucariotos, RPA-1 e RPA-2 se ligam ao DNA utilizando múltiplos domínios do tipo "OB fold". Em tripanosomatídeos, incluindo *Leishmania*, a RPA-1 apresenta um domínio "OB fold" canônico e um domínio estrutural truncado RFA-1. Em *L. amazonensis*, a RPA-1 sozinha pode formar um complexo *in vitro* com a fita telomérica rica em G. Neste trabalho, nós mostramos que a LaRPA-1 é uma proteína nuclear que se associa *in vivo* com os telômeros de *Leishmania*. Nós mapeamos os limites do domínio de ligação ao DNA "OB fold" utilizando mutantes deletoriais. Já que *Leishmania* e outros tripanossomatídeos não apresentam homólogos conhecidos de proteínas ligantes de terminais teloméricos, nossos resultados levantam questões sobre a função de RPA-1 nos telômeros destes parasitas.



Leishmania replication protein A-1 binds *in vivo* single-stranded telomeric DNA

J.L. Siqueira Neto ^{a,b}, C.B.B. Lira ^b, M.A. Giardini ^{a,b}, L. Khater ^b, A.M. Perez ^a,
L.A. Peroni ^b, J.R.R. dos Reis ^b, L.H. Freitas-Junior ^d, C.H.I. Ramos ^c, M.I.N. Cano ^{a,*}

^a Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, UNESP, 18618-000 Botucatu, SP, Brazil

^b Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

^c Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

^d Systems Biology of Pathogen, Institut Pasteur Korea, Seoul Korea

Received 5 April 2007

Available online 4 May 2007

Abstract

Replication protein A (RPA) is a highly conserved heterotrimeric single-stranded DNA-binding protein involved in different events of DNA metabolism. In yeast, subunits 1 (RPA-1) and 2 (RPA-2) work also as telomerase recruiters and, in humans, the complex unfolds G-quartet structures formed by the 3' G-rich telomeric strand. In most eukaryotes, RPA-1 and RPA-2 bind DNA using multiple OB fold domains. In trypanosomatids, including *Leishmania*, RPA-1 has a canonical OB fold and a truncated RFA-1 structural domain. In *Leishmania amazonensis*, RPA-1 alone can form a complex *in vitro* with the telomeric G-rich strand. In this work, we show that LaRPA-1 is a nuclear protein that associates *in vivo* with *Leishmania* telomeres. We mapped the boundaries of the OB fold DNA-binding domain using deletion mutants. Since *Leishmania* and other trypanosomatids lack homologues of known telomere end binding proteins, our results raise questions about the function of RPA-1 in parasite telomeres.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Replication protein A-1; *Leishmania amazonensis*; OB fold; Telomere end binding protein; Immunolocalization

Replication protein A (RPA) is a conserved, heterotrimeric, and single-stranded DNA-binding protein (SSB) involved in DNA metabolism [1]. Most RPA homologues identified so far consist of protein subunits of ~70 kDa (RPA-1), 32–34 kDa (RPA-2), and 14 kDa (RPA-3) [1]. RPA-1 from kinetoplastid protozoan, which includes the genus *Leishmania*, is smaller in size (~51 kDa) because it lacks the N-terminal domain (RPA70 N domain) involved in RPA–protein interactions. Kinetoplastid RPA-1 binds tightly to ssDNA [2] and in *Leishmania*, this protein subunit alone can form complex with telomeric G-rich strand [3, present work]. In *Crithidia fasciculata*, RPA apparently functions as a complex of three polypeptides that bind single-stranded DNA via RPA-1 [2].

Recent studies indicated a function for RPA in telomere maintenance. Mutations in the genes encoding *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* RFA-1 (Replication Factor A-1, RPA-1 homologue in yeast) respectively cause defects in telomere length regulation [4] and a reduction in telomere length [5]. In budding yeast, RFA-1 and RFA-2 facilitate the access of telomerase to chromosomal ends by regulating the telomerase-mediated growth of telomeres [6]. Human RPA-1 (hRPA-1), similarly to human POT1 (Protection of Telomeres 1) and ciliate TEBP (Telomere End-Binding Protein), modulates the unfolding of intramolecular G-quadruplex formed by G-rich single-stranded telomeric oligonucleotides *in vitro*, allowing telomere elongation by telomerase [7–10]. Moreover, hRPA and WRN (Werner syndrome) and BLM (Bloom syndrome) helicases are partners in complexes that actively unwind long telomeric duplex regions that were

* Corresponding author. Fax: +55 14 3815 3131.

E-mail address: micano@ibb.unesp.br (M.I.N. Cano).

pre-bound by the telomere repeat binding factor TRF2 *in vivo*, suggesting that all these proteins function in a common pathway at telomeric ends [11].

Leishmania RPA-1 was initially identified in affinity-purified telomerase-positive extracts as a protein that associates with G-rich single-stranded telomeric DNA [3]. *Leishmania* telomeric DNA consists of tandem repeats of 5'-TTAGGG-3' and terminates in a single-stranded protrusion known as the 3' G-rich overhang. The 3' G-rich overhang is the substrate for telomerase and interacts with telomeric proteins involved in telomere end protection and length maintenance [12,13].

In this report, we characterized the *Leishmania amazonensis* RPA-1 (LaRPA-1) and showed its co-localization with parasite telomeres. *In silico* analysis complemented by *in vitro* and *in vivo* assays provided insights into the interaction of LaRPA-1 with the telomeric DNA. This association occurs via an OB (oligonucleotide/oligosaccharide-binding) fold domain. Since *Leishmania* and other trypanosomatids lack homologues of known telomere end binding proteins, we speculate about the evolution of these proteins and the role played by RPA-1 at parasite telomeres. The common usage of the OB fold for interaction with telomeric DNA indicates the conservation of end-protection mechanisms [14].

Materials and methods

Parasite cultures. Promastigotes of *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) were grown in M199 (Cultilab) supplemented with 10% fetal calf serum (Cultilab), 25 mM Hepes and 1× antibiotic/antimycotic solution (Cultilab) at 28 °C.

LaRPA-1 cloning and sequence analysis. Genomic DNA was used to amplify the *L. amazonensis* homologue (LaRPA-1) of *L. major* Replication Protein A, subunit 1. A PCR product spanning the entire *L. amazonensis* sequence was inserted into the vector pCR 2.1 TOPO (Invitrogen). The LaRPA-1 sequence was deposited in the GenBank database under Accession No. AY493356. Sequence alignments were done with ClustalW and BLAST 2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>) using default parameters.

Expression of LaRPA-1 and deletion mutants using the pET system. Recombinant LaRPA-1 was obtained by inserting the *LaRPA-1* gene into *Escherichia coli* pET28a(+) vector (Novagen). The cloning strategy was PCR-based and was designed to generate a recombinant protein with an N-terminal His-tag. Three deletion mutants were also constructed as described above. The mutant LaRPA-1^{ΔC-term} contained a canonical OB fold DNA-binding domain (OB1) and a putative OB fold domain (OB2), both located in the N-terminal of LaRPA-1. The mutant LaRPA-1^{ΔOB1,2} contained only the C-terminal half of LaRPA-1. The mutant LaRPA-1^{ΔOB1} lacked the canonical OB1 fold domain. Recombinant proteins were expressed after induction with 1 mM IPTG for 3 h, denatured using 8 M urea, renatured and purified in Mono QTM column (GE Healthcare). Circular dichroism was used to confirm the secondary structure of the constructs.

Antibody generation. Recombinant LaRPA-1 was used to immunize two New Zealand white rabbits generating anti-LaRPA-1 serum. Full length LaRPA-1 recombinant protein was coupled to CNBr-activated SepharoseTM 4B (GE Healthcare) beads, and used to purify the antiserum according to users manual.

Electrophoretic mobility shift assay, antibody supershift, and competition assays. All conditions used for EMSA and the binding reactions, including binding temperature and oligoprobe concentration, were used as described

before [3]. Binding assays were done using 2.75 pmol of each purified recombinant protein, and 10 fmol of γ -³²P-end-labeled Tell probe 5'-(TTAGGG)₃-3'. Supershift assays were done incubating 100 μg of anti-serum anti-LaRPA-1 in the EMSA binding mixture for 10 min on ice prior to the addition of the Tell probe.

For the competition assays, we added 100, 550 or 900 fmol of unlabeled specific competitor (Tell) and 900 fmol of one of the unlabeled non-specific competitors: Tell-RNA 5'-(GUUAGG)₃-3'; Tell-C 5'-(CCC TAA)₃-3'; dsTell, formed by annealing Tell and Tell-C; nT1 5'-GTG TGGCAAGGGTAGCGC-3' and nT2 5'-CCCGGGATGCTCCGTC GC-3', to the binding assay with LaRPA-1. The non-telomeric oligonucleotides nT1 and nT2 are non-repetitive DNA sequences found in the *Leishmania* genome. The protein-DNA complexes in the absence or presence of a molar excess of competitors in three independent EMSA were assessed quantitatively using Scion Image software (www.scioncorp.com) [3].

Chromatin immunoprecipitation (ChIP). Chromatin from formaldehyde cross-linked log phase promastigotes (10⁸ cells), grown in non-synchronized cultures, was immunoprecipitated with anti-LaRPA-1 antiserum. DNA was extracted after reversing the cross-linking. DNA samples were slot-blotted and hybridized with labeled Tell, Tell-C, and GT-rich 5'-(TGTGTGGG)₁₀-3' probes using an established protocol [15]. An aliquot corresponding to 1% of the total DNA used in each experiment (input) was tested separately. Control assays were done using rabbit pre-immune serum and rabbit antiserum raised against the *L. amazonensis* telomerase reverse transcriptase component.

Indirect immunofluorescence (IF) combined with fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Log phase *L. amazonensis* promastigotes were subjected to IF followed by telomere detection using Telomere PNA FISH Kit/FITC (DakoCytomation) according to users manual. For IF, cells were washed in PBS and fixed in 1% formaldehyde for 5 min at 4 °C. After permeabilization with 0.1% Triton X-100 for 10 min at room temperature, cells were incubated with CNBr-purified anti-LaRPA-1 antibody followed by Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) as the secondary antibody. DAPI was used to stain nuclear and kinetoplast DNA. Images were acquired using Olympus BX61 Motorized Microscope and DP70 Olympus digital camera.

Results and discussion

LaRPA-1 binds telomeric DNA via a conserved N-terminal OB fold domain and shares sequence similarity with telomere end binding proteins

Telomere maintenance is essential for the protection of chromosomal ends [16–18]. Proteins that bind the 3' G-rich overhang work as *cis*-acting elements by providing access for telomerase and capping telomeres [13,16]. *Oxytricha nova* TEBP (OnTEBP) in ciliates, cell division control protein 13 (CDC13) in yeast and POT1 in higher eukaryotes and fission yeast are proteins that bind G-rich single-stranded telomeric DNA, recruit, and regulate telomerase [19–23]. These proteins share the structural OB fold domain also found in RPA-1 and other related proteins [24,25]. The yeast RPA is a general single-stranded DNA binding protein [1] that also interacts with telomeric sequences and is involved in telomerase regulation [4–6]. In budding yeast, RPA-1 and RPA-2 regulate telomerase action during cell cycle by specifically facilitating binding of Est1 to telomeres during S phase [6]. In addition, an RPA-1 mutant with a missense allele (*rfa-1-D228Y*) produced a synergistic reduction in telomere length when combined with a yKu70 mutation [5]. The same mutant in

fission yeast caused telomere shortening by itself [4]. In both cases, RPA-1 bound telomeres in a ChIP assay, suggesting that in yeast, RPA is directly involved in telomere maintenance [4,6]. In humans, RPA stimulates extension of G-rich DNA primers by the telomerase *in vitro* [26], probably unfolding the telomeric G-quadruplexes [10], which *in vivo* seems to be stimulated by interactions of RPA with RecQ helicases [11].

LaRPA-1, like other kinetoplast RPA-1 [2], lacked the N-terminal RPA70N domain found in all non-kinetoplast RPA-1, but shared with hRPA-1 and yRPA-1 a canonical N-terminal tRNA_{anti} (positions 23–106), which is an OB fold domain, a conserved DNA/RNA binding motif. In addition, LaRPA-1 has a truncated RFA-1 nucleic acid-binding domain (positions 6–242) (Fig. 1A). BLAST 2 and ClustalW were used to check amino acid sequence similarities among LaRPA-1, RPA-1 from higher eukaryotes and other telomere end binding proteins (Table 1

Table 1

Comparison of LaRPA-1 amino acid (protein) sequences between *L. amazonensis* and other species

Organisms	GenBank Accession No.	Protein identity (similarity) (%)
<i>Leishmania major</i>	CAJ05550	97 (98)
<i>Leishmania infantum</i>	CAM69415	97 (98)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	EAN97168	66 (81)
<i>Trypanosoma brucei</i>	EAN79866	66 (81)
<i>Homo sapiens</i>	NP_002936	34 (53)
<i>Mus musculus</i>	CAI23977	32 (51)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P22336	29 (52)
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_524274	34 (53)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_567576	32 (44)
<i>Plasmodium falciparum</i>	CAD51733	22 (39)

and Fig. 1B). LaRPA-1 shares sequence similarity with the structural domains DBD-A and DBD-B of hRPA-1 (Fig. 1A and Table 1) [27] and with the OB fold domain

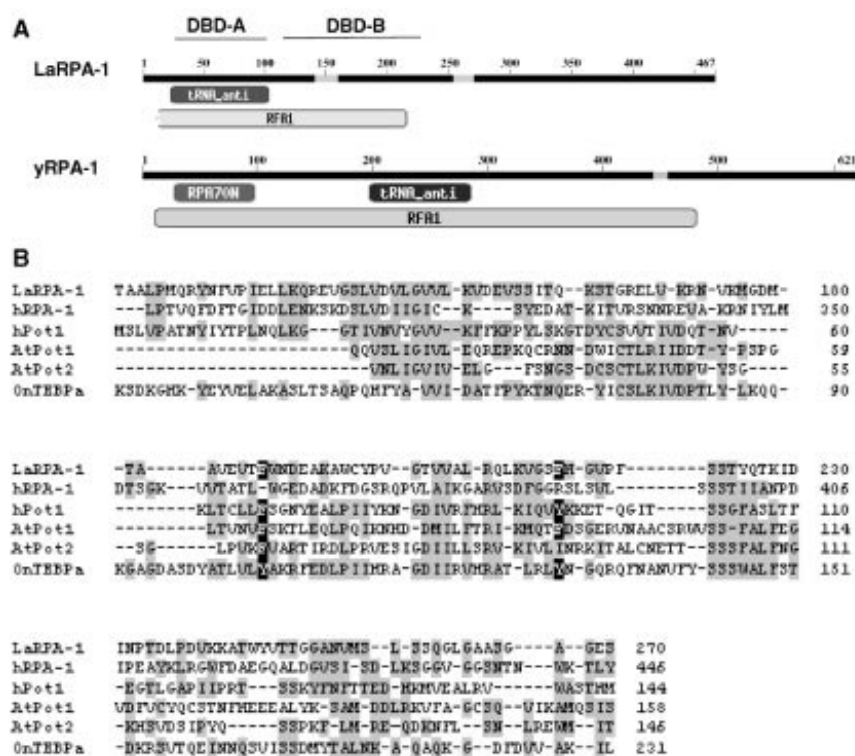


Fig. 1. LaRPA-1 shares sequence similarities with other RPA-1 and with the telomere binding domain of POT1 and OnTEBP alpha. (A) A diagram showing the localization of the canonical OB fold domain (tRNA_{anti}) in LaRPA-1 and yeast RPA-1 (yRPA-1) based on rpsblast analysis. RFA-1, corresponds to a region containing the RPA70N, DBD-A, and DBD-B structural domains shared partly by LaRPA-1 and completely by yRPA-1 and human RPA-1 (hRPA-1) [1]. (B) ClustalW multiple alignment of the amino acid sequences of part of the RFA-1 domain of LaRPA-1 and DBD-B domain of hRPA-1 and the corresponding domains of human POT1 (hPOT1, GenBank Accession No. AAH02923), *Arabidopsis thaliana* POT1 (AtPOT1, GenBank Accession No. AAX78213), AtPOT2 (GenBank Accession No. AAX78214) and OnTEBP alpha subunit (GenBank Accession No. P29549). Similar amino acids are highlighted in gray and some of the aromatic amino acids that are responsible for protein-telomeric DNA interactions in POT1 are indicated in white bold [27].

found in POT1 family members and in OnTEBP alpha subunit [21] (Fig. 1B). Indeed, some aromatic amino acids (F188, F214) responsible for the interaction of POT1 family members with telomeric DNA were present in LaRPA-1 (Fig. 1B) [20,21]. BLAST 2 pairwise sequence comparisons showed that the region containing amino acids 120–238 of LaRPA-1 shared 28–32% identity and 45% similarity with the N-terminal OB fold domain found in higher eukaryotes POT1 (Fig. 1B). This OB fold domain is responsible for the interaction of POT1 with the telomeric single-stranded DNA and is structurally similar to the RPA and RFA-1

domains found in most RPA-1 [28]. These sequence similarities suggested that LaRPA-1 may have a second DNA binding domain (putative OB2, amino acids 120–238) immediately adjacent to but separated by 14 amino acids from OB1 fold (amino acids 22–106). Our experimental approaches did not confirm the presence of this putative DNA binding domain in LaRPA-1 (see below).

The ability of LaRPA-1 to bind telomeric DNA was tested by EMSA using full-length recombinant protein and three deletion mutants (Fig. 2A provides a schematic representation of the constructs). Full-length recombinant

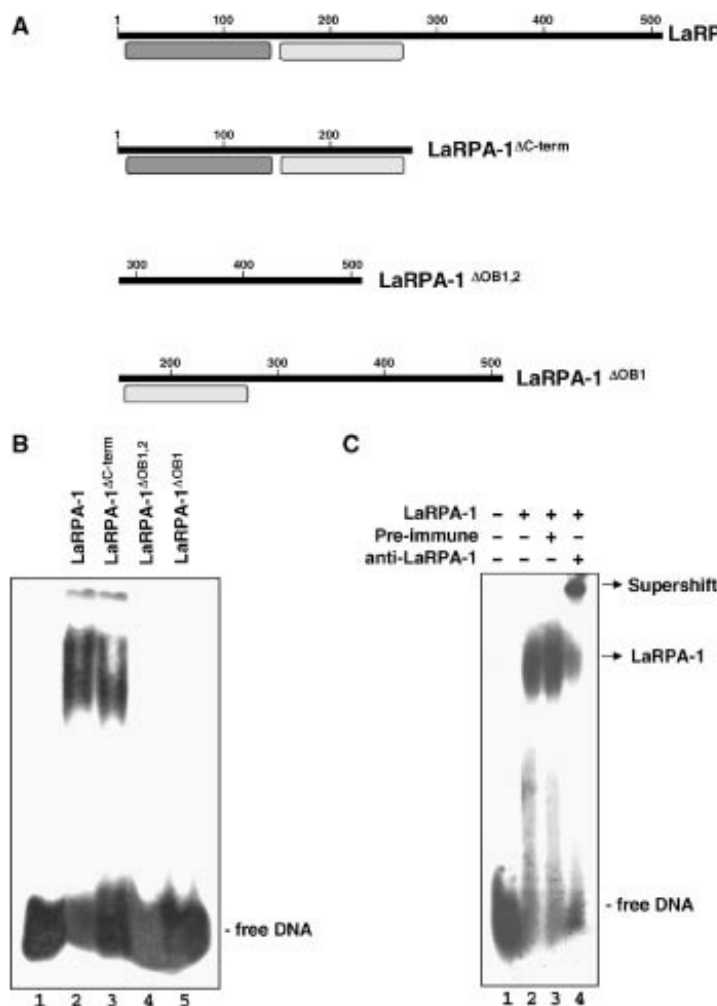


Fig. 2. LaRPA-1 binds DNA using a N-terminal OB fold domain. (A) The diagram shows the structure of recombinant LaRPA-1 and the deletion mutants. Dark gray box represents OB1 and light gray box represents the putative OB2. The diagrams are not to scale. (B) EMSA was done with labeled Tel1 (free DNA in lane 1) and recombinant proteins: LaRPA-1 (lane 2), LaRPA-1 Δ C-term (lane 3), LaRPA-1 Δ OB1,2 (lane 4) and LaRPA-1 Δ OB1 (lane 5). (C) Antibody supershift assay done with LaRPA-1 and labeled Tel1 in the presence of anti-LaRPA-1 serum (lane 4). Pre-immune serum did not supershift the complex (lane 3). Lane 2 shows a normal reaction done in the absence of serum. In lane 1, no protein was added to the reaction mixture.

LaRPA-1 and the mutant LaRPA-1^{ΔC-term} bound telomeric DNA efficiently (Fig. 2B, lanes 2 and 3), in contrast to the mutant proteins containing only the C-terminal region (LaRPA-1^{ΔOB1,2}) or the C-terminal and the putative OB2 domain (LaRPA-1^{ΔOB1}) (Fig. 2B, lanes 4 and 5). This result indicated that recombinant LaRPA-1 bound to telomeric DNA via the canonical N-terminal OB fold (OB1) DNA-binding domain. Deletion versions of *S. pombe* POT1 (SpPOT1) and OnTEBP alpha with N-terminal OB fold domains show increased DNA binding, indicating a functional relationship among these proteins [8,20]. Similar result was obtained when we estimated the dissociation constants of LaRPA-1^{ΔOB1,2} and full length LaRPA-1 bound to Tell (data not shown). However, hPOT1 that lacks the N-terminal OB fold domain can still co-localize with the telomeres in the nucleus. This finding probably reflects the fact that in humans, POT1 dynamically interacts with different subunits of the six multiprotein complex, shelterin [17] indicating that direct DNA binding mediated by the N-terminal OB fold is not the only mode of POT1 recruitment to telomeres [17,29]. Whether a similar mechanism governs the action of LaRPA-1 in parasite telomeres remains to be determined.

An antibody supershift assay using polyclonal anti-LaRPA-1 serum (Fig. 2C, lane 4) confirmed that the DNA-protein complex was formed by the interaction of LaRPA-1 with the G-rich telomeric sequence in EMSA (Fig. 2C, lane 2). No supershifting was seen in control experiments done with the same amount of pre-immune serum (Fig. 2C, lane 3).

The binding specificity of LaRPA-1 was tested using competition assays. Increasing concentrations (100–900 fmol) of unlabeled Tell oligonucleotide competed spe-

cifically with LaRPA-1 (Fig. 3A, lanes 3–5 and graph in Fig. 3B). LaRPA-1 did not bind double-stranded telomeric DNA or non-telomeric DNA (Fig. 3A, lanes 7, 8, and 10 and graph in Fig. 3B), but Tell-RNA and Tell-C abolished formation of the complex, respectively, in ~90% and 80% (Figs. 3A, lanes 6 and 9, and graph in Fig. 3B). This indicates that the binding of LaRPA-1 was not exclusive for the G-rich telomeric DNA.

ChIP assays were used to test the ability of LaRPA-1 to bind telomeres *in vivo*. The immunoprecipitated DNA and 1% input DNA were blotted and hybridized with end-labeled Tell, Tell-C, and GT-rich (representing a non-telomeric DNA) probes (Fig. 4A). The amount of single-stranded DNA that co-immunoprecipitated with LaRPA-1 relative to the input DNA in three independent experiments is shown in Fig. 4B. The results show that anti-LaRPA-1 immunoprecipitated almost the same amount of both G-rich and C-rich telomeric strand (~1%) and immunoprecipitated 0.88% of CA-rich non-telomeric DNA (hybridization with the non-telomeric GT-rich probe). Immunoprecipitation with pre-immune serum showed no hybridization signal while LaTERT co-immunoprecipitated exclusively with the G-rich telomeric DNA (Supplementary data). No hybridization signals were visible in mock (no serum) experiments (Fig. 4A). These results strongly suggest that LaRPA-1 binds both strands of the *Leishmania* telomeric DNA and CA-rich DNAs *in vivo*. Thus, RPA seems to have a conserved hidden preference for some DNA sequences which includes telomeres [5,7,30, present work], although this preference can not be compared with the high affinity and sequence specificity shown by POT1 and CDC13 for the G-rich telomeric strand [28,31].

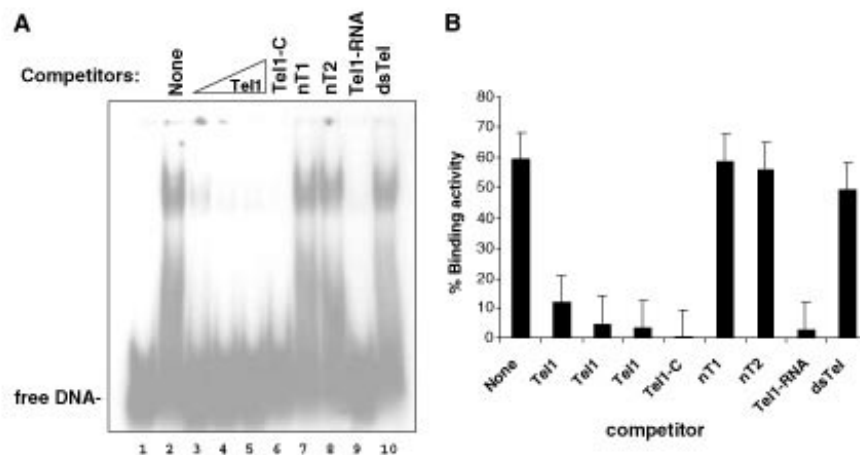


Fig. 3. LaRPA-1 binds single-stranded nucleic acids *in vitro*. (A) Competition assays were done with recombinant LaRPA-1 and 10 fmol of labeled Tell. Reaction in lane 1 was done without extract. In lane 2, no competitor was added to the reaction mixture. For specific competition assays, 100 fmol (lane 2), 550 fmol (lane 3) and 900 fmol (lane 4) of unlabeled Tell were used. Assays with non-specific competitors were done using 900 fmol of unlabeled Tell-C, nT1, nT2, Tell-RNA, and dsTel. (B) The results shown are the average $\pm$ SEM of two independent experiments. The amount of each complex formed in the presence of unlabeled competitor was expressed as the percentage of binding activity.

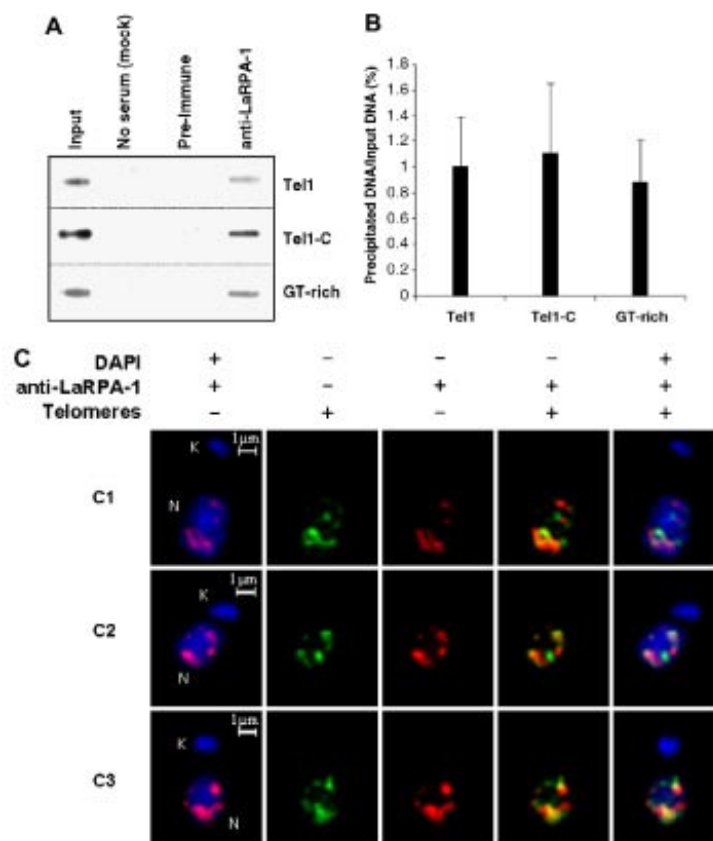


Fig. 4. LaRPA-1 co-precipitates with telomeric and GT-rich single-stranded DNA *in vivo* and co-localizes with telomeres. (A) ChIP assay done with *L. amazonensis* log phase promastigotes and anti-LaRPA-1. Control experiments were done with pre-immune serum and without serum (mock). One percent of the total DNA (input) and immunoprecipitated samples were slot-blotted and hybridized with the corresponding probes. (B) The amount of DNA recovered after precipitation relative to the initial input DNA was plotted in the graph. The results are the average $\pm$ SEM of three independent experiments. (C) IF using anti-LaRPA-1 (red) was combined with FISH using a PNA-telomere probe specific for TTAGGG repeats (green). DAPI (blue) was used to stain DNA in the nucleus (N) and in the kinetoplast (K). Images were organized in panels c1–c3 showing the co-localization patterns. Merge images were done using Adobe Photoshop. (For interpretation of color mentioned in this figure the reader is referred to the web version of the article.)

LaRPA-1 co-localizes with *Leishmania* telomeres

Using indirect immunofluorescence combined with FISH, LaRPA-1 was clearly detectable in *L. amazonensis* promastigote nucleus. Much of the protein co-localizes with telomeres as shown by the LaRPA-1 signal overlapped with most of the telomeric repeats (Fig. 4C, panels c1–c3). This is the first time that a replication protein is shown co-localizing with telomeres in the nucleus of a pathogenic protozoan.

Altogether, these results suggest that all eukaryotes use a single-stranded DNA binding protein to cap telomeres. A search in trypanosomatid genomes, including the genus *Leishmania*, for homologues of the known telomere end

binding proteins (POT1, CDC13 and TEBP) yielded no satisfactory results [32, data not shown]. We therefore speculate that among the primitive trypanosomatids, RPA-1 and other unknown factors might be counterparts of the G-strand telomere binding proteins present in higher eukaryotes. In agreement with this, very recently the associated factors of the yeast telomere end binding protein CDC13 were found to share sequence similarities with RPA-2 and RPA-3 subunits of the heterotrimeric RPA complex [33]. This suggests that CDC13 protein and its associated factors function as a telomere-specific RPA-like complex. This finding corroborates the hypothesis that trypanosomatids RPA is an ancestor of the higher eukaryotes telomere end binding proteins.

It will therefore be of interest to determine whether LaRPA-1 contributes to the maintenance of *Leishmania* telomeres.

Acknowledgments

The authors thank colleagues in Dr. Cano's laboratory for discussions about the experiments, Dr. S. Hyslop for editing the English. This work was supported by the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR, ID A50762). J.L.S.N. is supported by a doctoral studentship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. C.B.B.L., M.A.G. and L.K. are supported by doctoral studentships from FAPESP (Brazil).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.144.

References

- [1] M.S. Wold, Replication protein A: a heterotrimeric, ssDNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism, *Annu. Rev. Biochem.* 66 (1997) 61–91.
- [2] L.M. Brown, T. Melendy, D.S. Ray, Conservation of structure and function of DNA replication protein A in the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 10227–10231.
- [3] M.F. Fernández, R.R. Castellari, F.F. Conte, F. Gozzo, A.A. Sabino, H. Pinheiro, J.C. Novello, M.N. Eberlin, M.J.N. Cano, Identification of three proteins that associate *in vitro* with the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* G-rich telomeric strand, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 3050–3063.
- [4] Y. Ono, K. Tomita, A. Matsuura, T. Nakagawa, H. Masukata, M. Uritani, T. Ushimaru, M. Ueno, A novel allele of fission yeast rad11 that causes defects in DNA repair and telomere length regulation, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 7141–7149.
- [5] J. Smith, H. Zou, R. Rothstein, Characterization of genetic interactions with RFA-1: the role of RPA in DNA replication and telomere maintenance, *Biochimie* 82 (2000) 71–78.
- [6] V. Schramke, P. Luciano, P. Brevet, S. Guillot, Y. Corda, M.P. Longhese, E. Gilson, V. Géli, RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends, *Nat. Gen.* 36 (2004) 46–54.
- [7] A.J. Zaugg, E.R. Podell, T.R. Cech, Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 10864–10869.
- [8] G. Fang, T.R. Cech, The beta subunit of *Oxytricha* telomere binding protein promotes G-quartet formation by telomeric DNA, *Cell* 74 (1993) 875–885.
- [9] K. Paeschke, T. Simonsson, J. Postberg, D. Rhodes, H.J. Lipps, Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures *in vivo*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12 (2005) 847–854.
- [10] T.R. Salas, I. Petrusseva, O. Lavrik, A. Bourdoncle, J.L. Mergny, A. Favre, C. Sainfome, Human replication protein A unfolds telomeric G-quadruplexes, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 4857–4865.
- [11] P.L. Opreko, C. von Kobbe, J.P. Laine, J. Harrigan, I.D. Hickson, V.A. Bohr, Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 41110–41119.
- [12] M.J.N. Cano, Telomere biology of trypanosomatids: more questions than answers, *Trends Parasitol.* 17 (2001) 425–429.
- [13] T.M. Bryan, T.R. Cech, Telomerase and the maintenance of chromosome ends, *Curr. Opin. Cell Biol.* 11 (1999) 318–324.
- [14] R.M. Mitton-Fry, E.M. Anderson, T.R. Hughes, V. Lundblad, D.S. Wuttke, Conserved structure for single-stranded telomeric DNA recognition, *Science* 296 (2002) 145–147.
- [15] J.E. Lowell, G.A.M. Cross, A variant histone H3 is enriched at telomeres in *Trypanosoma brucei*, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 5937–5947.
- [16] A. Smogorzewska, T. de Lange, Regulation of telomerase by telomeric proteins, *Annu. Rev. Biochem.* 74 (2004) 117–208.
- [17] T. de Lange, Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres, *Genes Dev.* 19 (2005) 2100–2110.
- [18] E.H. Blackburn, Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions, *FEBS Lett.* 579 (2005) 859–862.
- [19] C.J. Nugent, T.R. Hughes, N.F. Lue, V. Lundblad, Cdc13p: a single-strand telomeric DNA binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance, *Science* 274 (1996) 249–252.
- [20] P. Baumann, T.R. Cech, POT1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans, *Science* 292 (2001) 1171–1175.
- [21] E.V. Shakhov, Y.V. Surovtseva, N. Osburn, D.E. Shippen, The *Arabidopsis* POT1 and POT2 proteins function in telomere length homeostasis and chromosome end protection, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 7725–7733.
- [22] C. Wei, C.M. Price, Cell cycle localization, dimerization, and binding domain architecture of the telomere protein cPot1, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 2091–2102.
- [23] D.E. Gottschling, V.A. Zakian, Telomere proteins: specific recognition and protection of the natural termini of *Oxytricha* macronuclear DNA, *Cell* 47 (1986) 195–205.
- [24] A.G. Murzin, OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding) fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences, *EMBO J.* 12 (1993) 861–867.
- [25] D.L. Theobald, D.S. Wuttke, Prediction of multiple tandem OB-fold domains in telomere end-binding proteins POT1 and Cdc13, *Structure* 12 (2004) 1877–1879.
- [26] S. Cohen, E. Jacoband, H. Manor, Effects of single-stranded DNA binding proteins on primer extension by telomerase, *Biochim. Biophys. Acta* 1679 (2004) 129–140.
- [27] S.A. Bastin-Shanower, S.J. Brill, Functional analysis of the four DNA binding domains of replication protein A. The role of RPA2 in ssDNA binding, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 36446–36453.
- [28] M. Lei, E.R. Podell, P. Baumann, T.R. Cech, DNA self-recognition in the structure of POT1 bound to telomeric single-stranded DNA, *Nature* 426 (2003) 198–203.
- [29] H. Xin, D. Liu, M. Wan, A. Safari, H. Kim, W. Sun, M.S. O'Connor, Z. Songyang, TPPI1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase, *Nature* 445 (2007) 559–562.
- [30] E. Bochkareva, S. Korolev, S.P. Lees-Miller, A. Bochkarev, Structure of the RPA trimerization core and its role in the multistep DNA-binding mechanism of RPA, *EMBO J.* 21 (2002) 1855–1863.
- [31] E.M. Anderson, W.A. Halsey, D.S. Wuttke, Delineation of the high-affinity single-stranded telomeric DNA-binding domain of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc13, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 4305–4313.
- [32] N.M. El-Sayed, P. Myler, D.C. Bartholomeu, D. Nilsson, G. Aggarwal, A.N. Tran, E. Ghedin, E.A. Wortley, A. Dekker, G. Blandin, S.J. Westenberg, E. Caler, G.C. Cerqueira, C. Branche, B. Haas, A. Anupama, E. Arner, L. Aslund, A. Altipoe, E. Bontempi, F. Brinaud, P. Burton, E. Cadag, D.A. Campbell, et al., The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease, *Science* 309 (2005) 409–415.
- [33] H. Gao, R.B. Cervantes, E.K. Mandell, J.H. Otero, V. Lundblad, RPA-like proteins mediate yeast telomere function, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14 (2007) 208–214.

3.2. Material e Métodos referentes aos resultados complementares

3.2.1 Clonagem dos genes *LaRPA-1* e *LaRBP38* em vetor de clonagem para produtos de PCR

O DNA genômico de *L. amazonensis* foi extraído de formas promastigotas em fase exponencial de crescimento. As células foram ressuspensas em solução de lise (TELT: 10mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM EDTA pH 8.0, 100mM cloreto de lítio e 0.1% Triton X-100). Os ácidos nucleicos foram extraídos 2-3 vezes com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), precipitados em solução de etanol 100% (Merck) na presença de 0,3M de acetato de sódio pH 5,2 e ressuspensos em 1X TE (Tris-HCl 10mM pH 7,5; 1mM EDTA pH 8,0) para serem tratados com 10µg de RNase A por 15 minutos a 37°C. A qualidade das extrações e a concentração de DNA em cada amostra foram estimadas através de corridas eletroforéticas em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5µg/ml) em 0,5X TAE (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA) ou dosagem das amostras em espectrofotômetro com luz U.V. (OD_{260nm}) (Sambrook & Russel, 2001).

Para amplificação dos genes *LaRPA-1* e *LaRBP38* em *L. amazonensis*, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (Tabela I) com base na sequência homóloga de *L. major*. Como molde, utilizou-se DNA genômico e cDNA de *L. amazonensis*. Para a construção do cDNA, foram utilizados mRNA poli (A)+ e a enzima SuperScript II RT (“SuperScript™ Choice System for cDNA Synthesis” da Life Technologies). Para a amplificação do fragmento por reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados 100ng de DNA genômico e 10ng de cDNA de *L. amazonensis*, aos quais foram adicionados 1X tampão da enzima Platinum Taq (Invitrogen), 1mM de dNTPs, 1mM MgCl₂, 5pmols de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 10% DMSO e 1U de Platinum Taq DNA polimerase. Os ciclos de amplificação por PCR foram: 1 ciclo de 95°C por 3 minutos e 36 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C (para amplificar o gene *LaRBP38*) e 52°C (para amplificar o gene *LaRPA-1*) por 35 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Cada um dos produtos de PCR foi separado em gel de agarose 0.8%, corados com brometo de etídeo, purificados em gel (“Perfectprep Gel Cleanup Kit”, Eppendorf) e seqüenciados (“Kit Big Dye Terminator v 3.0”, Applied Biosystems) utilizando-se os mesmos

iniciadores desenhados para a amplificação. Confirmada a sequência (utilizando-se os programas “Gene Runner” e BLAST, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), os produtos obtidos foram clonados no vetor “TOPO TA Cloning – pCR 2.1 TOPO” (Invitrogen). Bactérias *Escherichia coli* DH5 α competentes foram transformadas com o vetor e plaqueadas na presença de 100 μ g/ml de ampicilina, 0,004% X-Gal e 0,007% IPTG (Sambrook & Russel, 2001). Foram realizadas mini-preparações dos plasmídeos utilizando-se o Kit Perfectprep® Plasmid Mini (Eppendorf). Plasmídeos recombinantes foram sequenciados utilizando-se os iniciadores do vetor: M13 F (senso) e M13 R (antisenso) para confirmar a clonagem.

Tabela I - Oligonucleotídeos utilizados nesta tese. Os iniciadores das reações de amplificação dos genes *LaRPA-1* ou *LaRBP38* apresentam: em *itálico*, códons de iniciação; sublinhados, códons de parada; coloridos representam sítios de restrição para as enzimas *Nde*I, *Xho*I, *Sma*I, *Bam*HI e *Bgl*II.

Nome do oligonucleotídeo	Seqüência do oligonucleotídeo
Tel1	5' (TTA GGG) ₃ 3'
ScTel	5' (TGT GTG GG) ₁₀ 3'
GT-Rich	5' (GT) ₁₅ 3'
RPA1-F	5' ATG CAG CAG CCA GGC AGC 3'
RPA1-R	5' <u>TCA</u> GAC GTA AGC CTC GAT 3'
RPA1-pET-F	5' CAT ATG CAG CAG CCA G 3'
RPA1-pET-R	5' CTC GAG <u>TCA</u> GAC GTA AGC 3'
RPA1-Nt-pET-R	5' CTC GAG <u>GAC</u> GAC AAG GAC AT 3'
RPA-GFP-F	5' CCC GGG ATG CAG CAG CCA 3'
RPA-GFP-R	5' CGG GAT CCG ACG TAA GCC TC 3'
RPA-pX63Neo-F	5' CGG GAT CCA TGC ATC ATC ATC ATC ATA TGC AGC AG 3'
RPA-pX63Neo-R	5' GAA GAT CTT <u>CAG</u> ACG CAA GC 3'
RBP38-F	5' ATG CTC CGT CGC GTG TCT TTG 3'
RBP38-R	5' <u>CTA</u> CTG AAT GAG CAG ACC CGC 3'
RBP38-pET-F	5' CAT ATG CTC CGT CGC GTG 3'
RBP38-pET-R	5' CTC GAG <u>CTA</u> CTG AAT GAG 3'
RBP38-pX63Neo-F	5' GGA TCC ATG CTC CGT CGC 3'
RBP38-pX63Neo-R	5' AGA TCT <u>CTA</u> CTG AAT GAG 3'

3.2.2 Organização genômica dos genes *LaRPA-1* e *LaRBP38*

Para estimar o número de cópias dos genes *LaRBP38* e *LaRPA-1*, e verificar a organização genômica dos mesmos, realizaram-se experimentos de “Southern blotting” de DNA genômico e de DNA cromossomal. DNA genômico de *L. amazonensis* (~10µg) foi digerido com 15U das enzimas de restrição *ApaI*, *AvaII*, *HindIII*, *Hinfl*, *MluI*, *NcoI*, *PstI*, *SalI*, *SmaI* e *XhoI* de acordo com as especificações do fabricante (GE Healthcare). Os fragmentos digeridos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corados com brometo de etídeo, fotografados e transferidos (Sambrook & Russel, 2001) para membrana de nylon Hybond-N⁺ (GE Healthcare). Para a caracterização molecular a membrana foi hibridizada sob altas condições de estringência, primeiro utilizando-se como sonda o fragmento de 1,047Kb do gene *LaRBP38* e depois lavada e re-hibridizada com o fragmento interno de 743 pb de *LaRPA-1*. As sondas foram marcadas com α [³²P]dGTP (3000Ci/mmol) usando o “Megaprime DNA Labeling System” (GE Healthcare). As hibridizações foram realizadas em 24 horas a 65°C em 0,5M de tampão fosfato, 1mM EDTA pH 8,0, 7% SDS e 1% BSA e lavadas duas vezes com solução 2X SSC/0,1% SDS por 10 minutos a temperatura ambiente, duas vez com solução 40mM tampão fosfato/1mM EDTA pH 8,0/1% SDS por 10 minutos a temperatura ambiente e duas vez com essa mesma solução por 10 minutos a 50°C. Após a hibridização, a membrana foi exposta a filme de raios-X (Hyper film, GE Healthcare) a -80°C por 72 horas.

3.2.3. Mapeamento cromossômico dos genes *LaRPA-1* e *LaRBP38*

O mapeamento cromossômico dos genes *LaRBP38* e *LaRPA-1* foi realizado hibridizando-se cromossomos separados por PFGE, segundo o protocolo de Wincker *et al.* (1996) modificado por Conte & Cano (2005). Os padrões de peso molecular utilizados foram os cromossomos de *Saccharomyces cerevisiae* e *Hansenula wingeii* (BioRad). Os cromossomos foram corados com brometo de etídio, fotografados e transferidos para membrana de nylon Hybond N⁺ utilizando-se protocolo de transferência alcalina (Sambrook & Russel, 2001). Os “chromoblots” foram hibridizados com as mesmas sondas e sob as mesmas condições de estringência utilizadas para os “Southern blottings”.

3.2.4. Subclonagem dos genes *LaRPA-1* e *LaRBP38* em vetor de expressão pET-28a(+) e produção de proteínas recombinantes

A estratégia de clonagem dos insertos *LaRPA-1* e *LaRBP38* foi semelhante à adotada nas clonagens anteriores. Foram desenhados oligonucleotídeos específicos contendo na porção 5' sítios para enzimas de restrição presentes no sítio de clonagem do vetor de expressão vetor pET-28a(+) (His-Tag/Trombina/T7-Ta, Novagen). O oligonucleotídeo iniciador senso apresenta um sítio de restrição para a enzima *NdeI* e o reverso, para a enzima *XhoI*. (RPA1-pET-F e RPA1-pET-R; RBP38-pET-F e RBP38-pET-R, Tabela I). Utilizando-se estes sítios de restrição para clonagem, as proteínas recombinantes são expressa com uma cauda de poli-Histidina na porção N-terminal. O fragmento amplificado com estes oligonucleotídeos foi purificado em gel de agarose 1,0% e subclonado no vetor pCR 2.1 (Invitrogen), conforme descrito anteriormente. Desta forma, inserto e vetor foram digeridos com as mesmas enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, purificados por “Perfectprep Gel Cleanup Kit” (Eppendorf) e ligados (80 ng de inserto e 40 ng de vetor) na presença de 10 unidades da enzima T₄DNA ligase (Invitrogen) a 16°C por 17 horas. O produto desta ligação foi transformado em bactéria *E. coli* DH5α e plaqueado em meio contendo kanamicina para seleção de colônias transformadas com os vetores recombinantes pET/LaRPA-1 e pET/LaRBP38. Os clones positivos foram confirmados por meio de PCR utilizando iniciadores específicos do inserto, selecionados e reestruturados em outras placas contendo meio com o antibiótico Kanamicina. Esses plasmídeos foram seqüenciados com os oligonucleotídeos iniciadores *T7 promoter primer* e o *T7 terminator* para confirmação da presença do inserto, verificação do quadro de leitura e da integridade de cada seqüência clonada. O mutante deletional *LaRPA-1*^{ΔCterm} foi clonado no vetor pET-28a(+) seguindo-se o mesmo protocolo, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores RPA1-pET-F e RPA1-Nt-pET-R (Tabela I).

Na etapa seguinte, bactérias competentes “*E. coli* BL21(DE3) RP *Códon-Plus*”, utilizada na expressão protéica das ORFs com códons raros para Arg (R) e Pro (P), foram transformadas pelo método PEG com os plasmídeos de interesse (Sambrook & Russel, 2001). Para realização do teste de expressão das proteínas recombinantes, as bactérias transformadas foram inoculadas em 50 ml meio LB com kanamicina (50 µg/mL) e cloranfenicol (50 µg/mL). As expressões das proteínas foram conduzidas a 37°C, a 30°C, 25°C ou a 20°C, com agitação constante de 200

ciclos por minuto. As expressões das proteínas foram induzidas adicionando-se IPTG (1 mM) quando OD₆₀₀ estava aproximadamente em 0,8. Aliquotas de 1,0 mL de cultura foram coletadas antes da adição do IPTG (amostra não induzida), 1, 2 e 3 horas após a indução. Estas amostras foram submetidas a centrifugação de 13.200 x g por 2 minutos, e o precipitado foi suspenso em 50 µL de água e 50 µL de tampão de amostra 2x concentrado. O DNA das amostras foi quebrado mecanicamente utilizando-se sonicator. Em seguida, as amostras foram mantidas a 100°C durante 5 minutos (fervidas) e centrifugadas a 13200 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. O restante das culturas inoculadas com as bactérias recombinantes foi coletado 5 horas após a indução, centrifugado a 5.000 x g por 10 minutos. Ressuspendeu-se os precipitados em 500 µl de tampão de lise contendo tris-HCl (50 mM, pH 8,0), NaCl (50 mM) e EDTA 10 mM (15 ml/l de cultura), lisadas com aplicação de sonicator e centrifugadas a 17000 x g por 15 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes após a centrifugação compreendem as frações solúveis e os precipitados, as frações insolúveis de proteínas.

Na análise qualitativa das proteínas utilizou-se a eletroforese de proteínas em SDS-PAGE (12 %). As amostras (5 µL) foram aplicadas no gel de empacotamento (5%) e as proteínas separadas no gel de corrida (12 %). A eletroforese foi conduzida com a utilização do *Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad)*, utilizando a voltagem de 180 V durante 60 min em tampão Tris-glicina SDS pH 8,0. O gel foi corado durante 120 min com *Coomassie Brilliant Blue R* (Bio-Rad) e descorado em ácido acético/etanol/água (3/2/3, v/v/v) durante 90 minutos em temperatura ambiente.

3.2.5. Ressolubilização das proteínas recombinantes LaRPA-1 e LaRBP38

Para ressolubilização das proteínas presentes nos corpos de inclusão correspondente à fração insolúvel do extrato total, ressuspendeu-se esta fração em tampão de lise e solubilizou-se com adição lenta de solução de uréia 8 M até a concentração final de uréia de ~7 M. Após solubilização, procedeu-se com a diálise em tampão fosfato 100 mM (pH 8,2), por 16 h a 4 °C para remoção da uréia (agente desnaturante) promovendo assim o dobramento adequado das proteínas, podendo estas voltarem à conformação adequada e consequentemente voltando à fase solúvel. Após a diálise, as amostras de LaRBP38 e de LaRPA-1 foram centrifugadas a 10000 x g

por 30 min, a 4°C, para a remoção de precipitado (moléculas protéicas que não foram capazes de se dobrar de forma adequada durante a remoção da uréia) e as proteínas foram analisadas novamente em gel SDS-PAGE. O mutante deletional LaRPA-1^{ΔCterm} também foi expresso na forma insolúvel e passou pelo processo de ressolubilização sob o mesmo protocolo adotado para a proteína LaRPA recombinante inteira.

3.2.6. Estimativa do coeficiente de dissociação (K_d) entre LaRPA-1 e LaRPA-1^{ΔCterm}, e DNAsf telomérico

As condições utilizadas nas reações de mobilidade em gel de eletroforese (EMSA), incluindo temperatura de ligação e concentrações dos oligonucleotídeos marcados radioativamente foram seguidas conforme descrito em Fernández et al. (2004), com pequenas modificações.

Os ensaios foram realizados com as proteínas recombinantes renaturadas LaRPA-1 e LaRPA-1^{ΔCterm} em 1X tampão de ligação: 25 mM HEPES, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, pH 8.0, 100 mM KCl, 10% glicerol (v/v), 0.1% NP-40 (v/v), 0.5 mM DTT e 100 ng de poli (dI•dC). poli (dI•dC) (Amersham Biosciences). As amostras foram incubadas no gelo por 30 min. antes de aplicadas em gel PAGE 6% não denaturante (37.5:1, acrilamida:bis-acrilamida m/m) contendo 0.5X TBE (44.5 mM Tris base, 44.5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 8.0) à 4 °C seguidas por eletroforese à 150 V por ~3 h.

Na determinação das constantes de dissociação (K_d) da interação das proteínas LaRPA-1 e LaRPA-1^{ΔCterm} com o oligonucleotídeo telomérico Tel1 (Tabela I) foram realizados diferentes ensaios de mobilidade em gel com a quantidade fixa do oligonucleotídeo marcado radioativamente (25 pmol) e variando-se a concentração de proteína em cada reação, com concentração máxima de 90 nM de proteína e mínima de 2,51 nM. As análises quantitativas foram realizadas pelo programa Scion Image (www.scioncorpo.com) conforme descrito em Fernández et al (2004).

3.2.7. Imunização de coelhos para produção de anticorpos

Porções de um gel SDS-PAGE contendo as bandas correspondentes às proteínas recombinantes LaRPA-1 (700 µg) ou LaRBP38 (700 µg) foram excisadas e homogenizadas na presença de PBS 1X (PBS, 0.15 M NaCl e 10mM fosfato de sódio, pH7.2) e emulsificados com adjuvante completo de Freund (vol/vol). As suspensões foram injetadas subcutaneamente em coelhos fêmeas Nova Zelândia. As injeções subcutâneas foram repetidas com (800 µg) das proteínas emulsificadas em 2 X Adjuvante Incompleto de Freund 1:1 (v:v). Os coelhos sofreram uma última injeção contendo 900 µg das proteína por via intravenosa 42 dias após o início da imunização, e os soros foram coletados no dia 50 por punção cardíaca. Os anticorpos anti-LaRPA-1 e anti-LaRBP38 presentes nos soros dos respectivos coelhos foram testados em ensaios de Western blotting.

3.2.8. Purificação dos anticorpos anti-LaRPA-1 em coluna de CNBr

Para purificar anticorpos policlonais anti-LaRPA-1 de um soro de coelho anti-LaRPA-1, utilizou-se colunas de CNBr ativada (GE Healthcare). Inicialmente a resina foi ativada em HCl 1mM, conforme recomendações do fabricante. Em seguida, 0,3 g da resina pré-ativada foi misturada com ~3 mg de proteína LaRPA-1 recombinante previamente purificada (ver item 3.2.5). Esta incubação foi feita em 500 µl de tampão contendo 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,3) e 0,5 M NaCl por 16 horas a 4°C. O soro de coelho imunizado com a proteína LaRPA-1 foi então passado pela coluna. A eluição dos anticorpos foi realizada com tampão 100 mM, NaAc pH 4.4, com gradiente crescente de NaCl, variando de 0,1 M até 2,0 M.

3.2.9. Imunodeteccção de proteínas por Western blotting

Proteínas foram aplicadas em géis SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose (BioRad) em tampão de transferência: 48 mM Tris Base, 39 mM glicina, 20% metanol e 0,0375% SDS por 16 h a 4°C (Sambrook & Russel, 2001). A detecção das proteínas foi realizada utilizando-se o Kit (Amplified Alkaline Phosphatase Immun-Blot Assay Kit, BioRad). Anticorpos primários (anti-LaRPA-1 ou anti-LaRBP38) foram usados na diluição de

1:1.000 e as reações foram reveladas com anticorpo secundário diluído 1:20.000 (anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina), de acordo com as especificações do fabricante do kit.

3.2.10. Clonagem dos genes *LaRPA-1* e *LaRBP38* em vetor pX63Neo

Inicialmente, procedeu-se com a amplificação por PCR dos genes *LaRPA-1* e *LaRBP38* com oligonucleotídeos específicos (RPA-pX63Neo-F e *LaRPA*-pX63Neo-R, RBP38-pX63Neo-F e *LaRBP38*-pX63Neo-R, Tabela I), contendo na região 5' sítios para enzimas de restrição (*Sma*I e *Bgl*II) presentes no sítio de clonagem do vetor pX63Neo. Em seguida, os produtos amplificados por PCR foram purificados em gel e subclonados em vetor pCR 2.1/TOPO. Estes plasmídeos foram multiplicados em bactéria *E. coli* DH5 α , extraídos por mini-preparação e digeridos com as enzimas *Sma*I e *Bgl*II para clonagem direcionada nos sítios *Sma*I e *Bgl*II do vetor pX63Neo (Lebowitz et al, 1991). As reações de ligação dos insertos *LaRpa-1* (*Sma*I/*Bgl*II) e *LaRBP38* (*Sma*I/*Bgl*II) com o vetor pX63Neo (*Sma*I/*Bgl*II) foi realizada utilizando-se 80 ng de cada inserto, 40 ng do vetor e 10 unidades da enzima T₄DNA ligase (INVITROGEN) por 17 horas a 16°C. Os produtos das ligações foram transformados em bactérias *E. coli* DH5 α , que foram plaqueadas e encubadas por 16 horas em uma estufa a 37°C. A confirmação das clonagens se deu por PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos dos insertos.

3.2.11. Transformação de *L. amazonensis* com vetores *LaRPA-1*/pX63Neo ou *LaRBP38*/pX63Neo para os ensaios de superexpressão

Para realizar as transfecções, culturas de *L. amazonensis* na forma promastigota foram lavadas 2 vezes em PBS 1X e ressuspensas em CITOMIX (120 mM KCl, 0.15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄, 25 mM HEPES, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, pH 7.0) para concentração final de 4 x 10⁷ células/ml em gelo. Cada suspensão de células foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,4 mm (BioRad) com 50 μ l da construção *LaRBP38*/pX63Neo ou *LaRPA-1*/pX63Neo purificados na concentração aproximada de 5 μ g/ μ l. As células foram eletroporadas em aparelho Gene Pulser Xcell System (BioRad) a 2,25 kV/cm e 500 μ F. Após a eletroporação, incubou-se cada alíquota por 10 min. no gelo e recuperou-se os parasitas cultivando-os em 8 ml

de M199 sem droga de seleção, por 16 h a 28°C. Após a incubação as células foram plaqueadas em meio M199 semi-sólido em placas de petri contendo 50 µg/ml de G418.

3.2.12. Expressão em *Leishmania* da proteína LaRPA-1 em fusão com GFP

O vetor pXGFP(S56T)-PR (Guevara et al., 2001) foi utilizado para clonagem de LaRPA-1 com a finalidade de expressar a proteína LaRPA-1 em fusão com a *Green Fluorescent Protein* (GFP) em *Leishmania* (Guevara et al, 2001). Foram utilizados os sítios *Sma*I e *Bgl*II para realização da clonagem adotando-se o mesmo procedimento utilizado para as clonagens no vetor pX63Neo, com os oligonucleotídeos iniciadores (RPA-GFP-F e RPA-GFP-R, Tabela I). O oligonucleotídeo antisenso não contém códon de parada para permitir que a proteína recombinante saia em fusão com a GFP na porção C-terminal. Após confirmação da clonagem foi realizada uma midipreparação com Kit Perfectprep® Plasmid Midi (Eppendorf) para obtenção de plasmídeos pXGFP(S56T)-PR e LaRPA-1-GFP, e realização das transfecções de *Leishmania*. As transfecções foram realizadas seguindo-se os mesmos procedimentos descritos para a transfecção com plasmídeos de superexpressão, com a única modificação que os transfectantes com o vetor pXGFP ou pX-LaRPA1/GFP foram analisados após incubação em meio M199 líquido na ausência de G418. Transfectantes expressando a proteína quimérica foram observados em microscopia de fluorescência.

3.2.13. Imunoprecipitação da cromatina

A imunoprecipitação da cromatina para a análise das interações proteína-DNA *in vivo* foi realizada conforme descrito no artigo apresentado no item 3.1 desta tese (Siqueira Neto et al., 2007). As hibridizações subseqüentes foram realizadas com as sondas Tell, *Sc*Tel e GT-rich (Tabela I).

3.2.14. Imunofluorescência para análise da localização subcelular das proteínas LaRPA-1 e LaRBP38

Os ensaios de imunofluorescência estão descritos no artigo apresentado no item 3.1 desta tese (Siqueira Neto et al., 2007)

3.3. RESULTADOS COMPLEMENTARES

São inicialmente apresentados os resultados complementares referentes à proteína LaRPA-1. Em seguida são apresentados os resultados complementares referentes à proteína LaRBP38.

3.3.1. Resultados referentes à proteína LaRPA-1

3.3.1.1. Caracterização do gene *LaRPA-1*

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene foram desenhados com base na sequência que codifica a proteína RPA-1 obtida a partir de sequência homóloga presente no banco de dados público do genoma de *L. major*. A proteína foi identificada por espectrometria de massa (Q-TOF MS/MS) e a partir da sequência *de novo* de peptídeos tripticos da proteína nativa (MS/MS) de *L. amazonensis*, capaz de interagir *in vitro* com sequências teloméricas desta espécie (Fernández et al., 2004).

O gene amplificado foi então clonado e sequenciado. A tradução das sequências nucleotídicas obtidas do gene *LaRPA-1* indicou a presença de ORF única. O gene *LaRPA-1* também foi amplificado a partir de uma biblioteca de cDNAf gerada a partir de mRNA total, sugerindo que este gene é transcrito (dado não mostrado).

Comparações entre sequências homólogas usando o programa e Blastp (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) mostram que a proteína RPA-1 está presente em diversos grupos da escala evolutiva, apresentando um domínio estruturalmente conservado, responsável pela ligação do peptídeo ao DNA simples-fita. Dentre os Kinetoplastida RPA-1 também é bastante conservada. A Tabela II mostra o grau de conservação da proteína RPA-1 dentre diferentes espécies.

Tabela II – Conservação da proteína LaRPA-1. Análise comparativa do alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas LaRPA-1, utilizando o programa BLASTp. Os valores representam a porcentagem de identidade obtida em cada alinhamento.

	Número de acesso no GenBank	LaRPA-1
<i>Leishmania major</i>	CAJ05550	97 %
<i>Leishmania infantum</i>	XP_001470220	98 %
<i>Crithidia fasciculata</i>	CAA80682	91 %
<i>Trypanosoma cruzi</i>	XP_819019	73 %
<i>Trypanosoma brucei</i>	XP_828978	67 %
<i>Homo sapiens</i>	NP_002936.1	32 %
<i>Drosophyla melanogaster</i>	NP_524274.1	32 %
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P22336	27 %
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_567576.1	26 %
<i>Plasmodium falciparum</i>	CAD51733	22 %

Experimentos de “Southern blotting” permitiram estimar através da análise do perfil de hibridizações, o número de cópias do gene *LaRPA-1* no genoma de *L. amazonensis*. Com a sonda *LaRPA-1* os perfis de hibridização apresentados na Fig. 15A sugerem que o gene *LaRPA-1* está presente em baixo número de cópias ou cópia única no genoma desta espécie.

A análise do mapeamento cromossômico mostra que o gene *LaRPA-1* é hibridizado em um único cromossomo. A Fig. 15B demonstra que o gene *LaRPA-1* se localiza em um cromossomo com aproximadamente 1,3 Mb (banda cromossômica 20). Este resultado corrobora a hipótese de que este gene está presente provavelmente em cópia única no genoma de *L. amazonensis*. Além disso, uma busca no banco de dados de *L. major* confirmou que o gene que codifica LaRPA-1 está presente em cópia única no genoma dessa espécie.

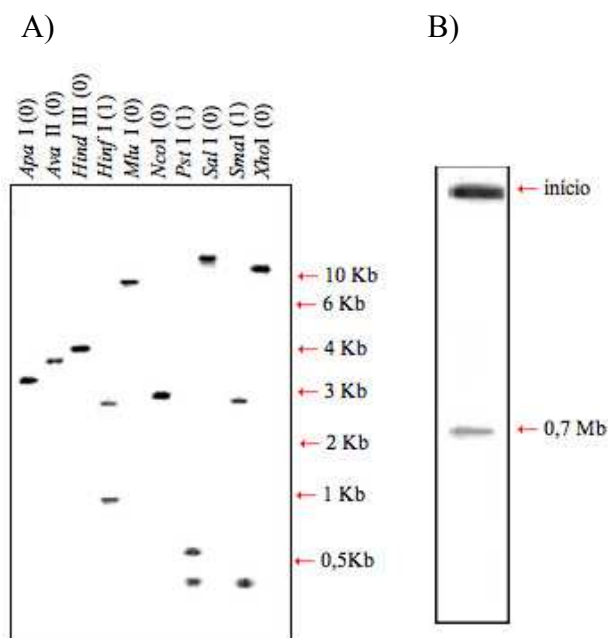


Figura 15: Organização genômica e mapeamento cromossômico do gene *LaRPA-1*. Em **A)** DNA genômico de *L. amazonensis* foi digerido com *Apa*I (linha 1), *Ava*II (linha 2), *Hind*III (linha 3), *Hinf*I (linha 4), *Mlu*I (linha 5), *Nco*I (linha 6), *Pst*I (linha 7), *Sal*I (linha 8), *Sma*I (linha 9) e *Xho*I (linha 10), separado em gel de agarose 0,8% e transferido para membranas de nylon que foram hibridizadas sob condições de alta estrigência com os fragmentos de *LaRPA-1* marcados com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$. Os números entre parênteses apresentam a quantidade de sítios de restrição para a enzima em questão presentes na sequência do gene utilizado como sonda. Em **B)** bandas cromossômicas de *L. amazonensis* fracionadas por PFGE em gel de agarose 1,1% foram transferidas para membranas de nylon e hibridizadas com a sonda de *LaRPA-1*.

3.3.1.2. Determinação da afinidade de LaRPA-1 e LaRPA-1^{ΔCterm} pelo DNAsf telomérico

Para determinar a constante de dissociação do complexo proteína LaRPA-1 com o DNA telomérico, realizamos ensaios de mobilidade em gel com quantidade constante do oligonucleotídeo Tell e diluições seriadas (2 vezes) de LaRPA-1 (Fig. 16). Os resultados foram plotados em gráfico de regressão não linear e o K_d estimado para LaRpa-1/DNAsf foi 75,52 nM como pode ser observado no gráfico apresentado na Fig. 16.

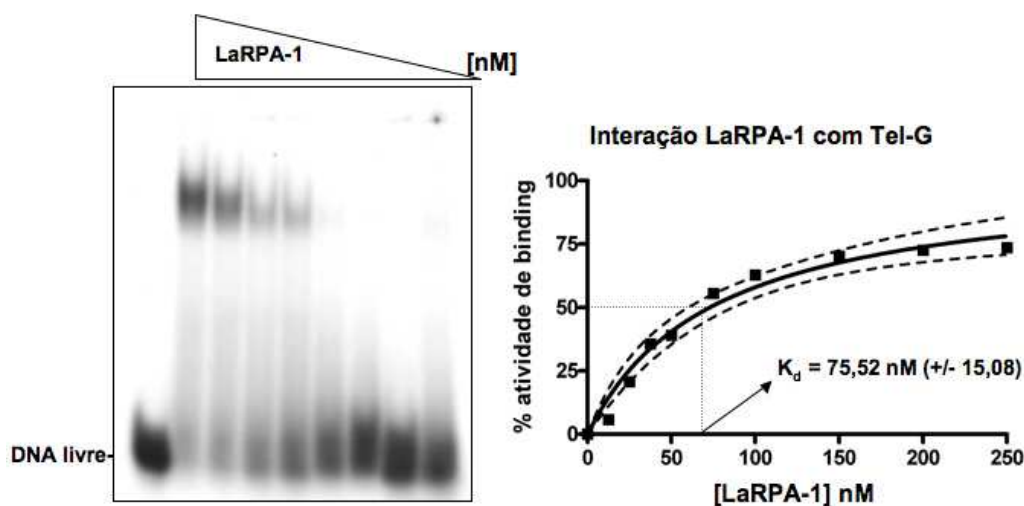


Figura 16: Determinação do K_d de LaRPA-1 com o DNAsf telomérico. Na esquerda está o ensaio de mobilidade em gel. A primeira linha do gel não apresenta extrato protéico (oligo Tel1 livre). Na demais linhas a quantidade de Tel1 foi constante e igual a 3,5 fmol e a concentração de proteína LaRPA-1 variou de maneira proporcional de 90 nmol a 2,5 nmol. Na direita temos o gráfico de regressão não linear obtido pelo programa GraphPad e a indicação do K_d .

Realizamos também a determinação da constante de dissociação da proteína mutante LaRPA-1 ^{Δ Cterm}, contendo apenas o domínio de ligação ao DNAsf. Para realizar o ensaio com a proteína mutante foram seguidos exatamente os mesmos parâmetros utilizados para a proteína em sua forma inteira (Fig. 16). O resultado obtido do K_d LaRPA-1 ^{Δ Cterm} com o DNAsf telomérico é de 42.24 nM, conforme pode ser verificado na Fig. 17. Este valor é menor que o obtido com a proteína inteira, o que significa que o mutante contendo apenas o domínio de ligação do DNAsf apresenta maior afinidade pelo DNA do que a proteína inteira.

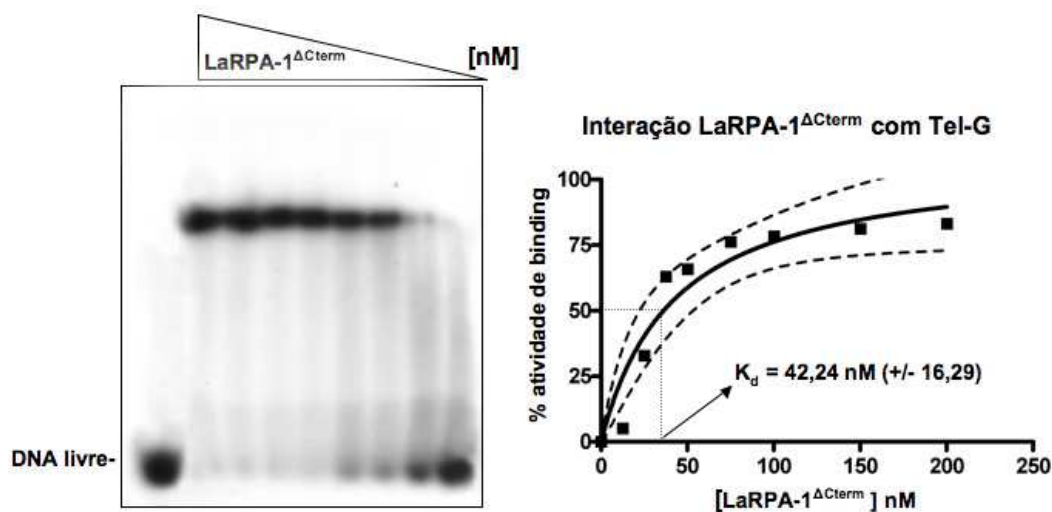


Figura 17: Determinação do K_d de LaRPA-1 Δ Cterm com o DNAsf telomérico. Na esquerda, o ensaio de mobilidade em gel de eletroforese evidencia o DNA telomérico Tel1 utilizado como sonda. Na primeira linha temos o DNA livre (sem proteína). Nas linhas de 2 a 9 temos um gradiente decrescente da quantidade de proteína adicionada à reação. Na direita está a representação gráfica do gel à esquerda mostrando a estimativa constante de dissociação.

3.3.1.3. Tentativa de superexpressão da proteína LaRPA-1 em *L. amazonensis*

O gene *LaRPA1* foi clonado no vetor pX63Neo, que é específico para expressão em *Leishmania* (LeBowitz et al., 1990). O objetivo deste experimento era avaliar um possível efeito fenotípico da superexpressão das proteínas LaRPA-1 e LaRBP38 e determinar a eventual função destas proteínas em *Leishmania*. Porém algumas dificuldades foram encontradas nestes ensaios de superexpressão que acabaram impossibilitando a análise dos dados.

Primeiramente observamos com frequência casos onde os parasitas não transfectados, ou transfectados sem o plasmídeo, apresentavam resistência à droga de seleção, impossibilitando a seleção de possíveis clones recombinantes. Uma outra dificuldade estava relacionada à baixa eficiência de transfecção, que pôde ser observada ao se utilizar a GFP como proteína repórter Fig. 18. Os protocolos de transfecção de *Leishmania* estão bem estabelecidos principalmente para *L. major*. Em nosso laboratório manipulamos a espécie *L. amazonensis* e pudemos perceber que

os protocolos tradicionais não se mostraram adequados, e necessitam de ajustes futuros. Estes problemas dificultaram a obtenção de clones transfectantes para que se pudesse prosseguir com as análises funcionais.

3.3.1.4. Superexpressão da proteína LaRPA-1 em fusão com GFP em *L. amazonensis*

Também foi realizada a clonagem do gene LaRPA-1 no plasmídeo pXGFP(S56T)-PR para superexpressar a proteína de interesse fusionada à GFP. Com esta técnica pretendíamos determinar a sublocalização celular da proteína LaRPA-1. Após a transfecção as células foram deixadas 24h em cultura e os transfectantes foram analisados por microscopia de fluorescência. Inicialmente a transfecção foi realizada com o plasmídeo pXGFP(S56T)-PR, sem a presença do inserto, apresentando distribuição global por toda a célula conforme ilustra a Fig. 18.

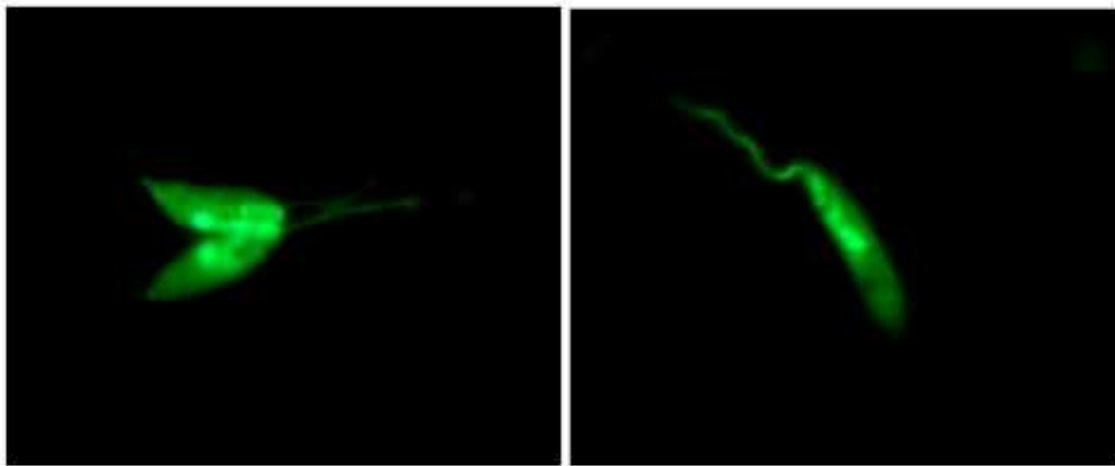


Figura 18: Expressão de pXGFP em *L. amazonensis*. As figuras ilustram células em cultura transfectadas com o vetor pXGFP(S56T)-PR que promove a expressão da proteína GFP. A figura da esquerda ilustra duas células em divisão e a da direita uma célula, ambas observadas em microscopia de fluorescência com aumento de 100X.

Após confirmar a expressão da proteína GFP sozinha, promastigotas de *L. amazonensis* foram transfectados com a construção LaRpa-1/GFP. As imagens apresentadas na Fig. 19 sugerem que a proteína LaRPA-1 apresenta localização nuclear em *L. amazonensis*. Porém, a baixa quantidade de células transfectadas (< 1%) demonstra problemas na eficiência de transfecção. Este valor foi obtido por estimativa de contagem de 10 campos microscópicos, com ~10 células por campo, apresentando 1 célula ou menos transfectada para cada conjunto de 10 campos. Devido ao baixo número de transfectantes não foi possível isolar-se clones. Portanto não foi possível verificar se a proteína LaRPA-1 em fusão com GFP também era capaz de se associar com a sequência telomérica do parasita *in vitro* ou *in vivo* usando ensaios de interação proteína-DNA. Podemos observar na Fig. 19 que a proteína LaRPA-1 é encontrada em todo o núcleo, não sendo possível determinar sua exata localização ou distribuição. Este fato ocorre provavelmente devido ao fato de que o plasmídeo pXGFP(S56T)-PR tem sua expressão regulada por um promotor ribossomal. Este é um promotor classificado como forte, induzindo a produção de grande quantidade de proteína rapidamente. Sendo assim, o núcleo é totalmente ocupado pela proteína LaRPA-1 fusionada com GFP. Por isso, para confirmar a localização sub-celular da proteína LaRPA-1, optamos por realizar ensaios de imunofluorescência indireta utilizando o anticorpo anti-LaRPA-1.

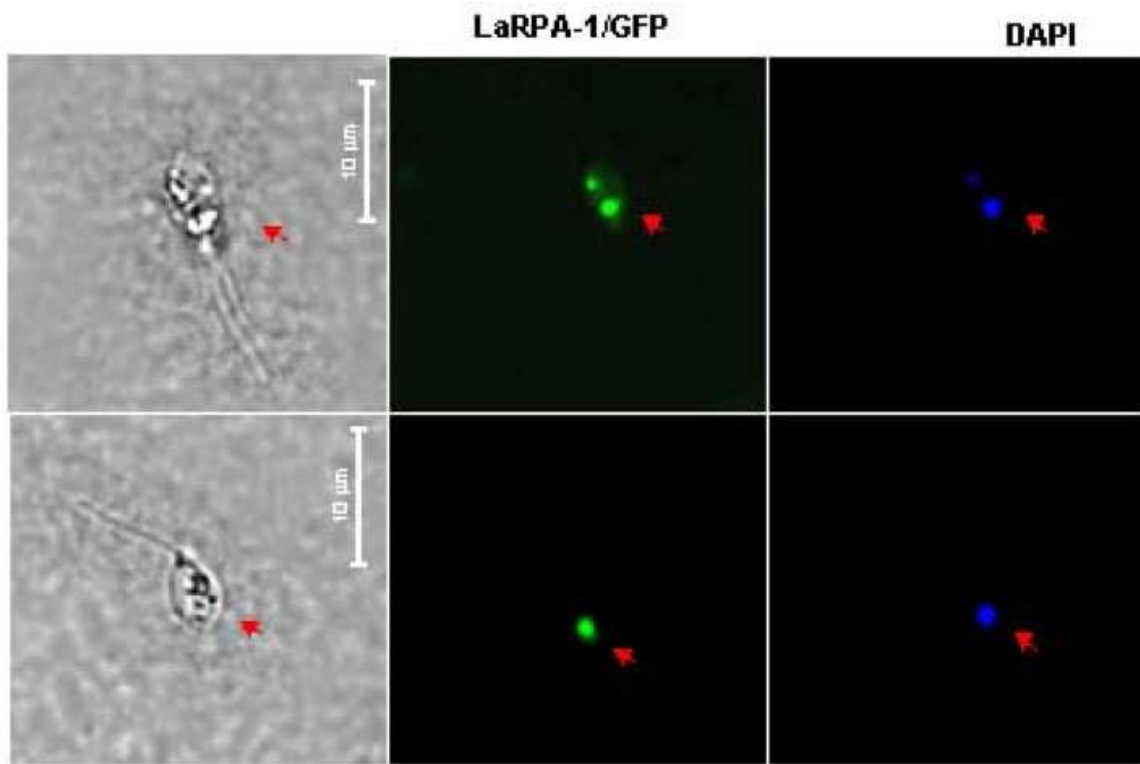


Figura 19: Expressão da fusão LaRPA-1/GFP em *L. amazonensis*. Localização sub-celular de LaRPA-1 em fusão com a proteína GFP. Na coluna da esquerda imagens em campo claro. Na coluna central observamos imagens com um filtro para intensificar o brilho de GFP sob fluorescência. Na coluna da direita o filtro destaca a marcação de DAPI específica para ácidos nucleicos.

Os resultados da localização precisa da proteína LaRPA-1 no núcleo de *L. amazonensis*, co-localizando inclusive com o DNA telomérico foram obtidos através da combinação de técnicas de imunofluorescência e hibridização *in situ*. Estes resultados estão apresentados no artigo do item 3.1 desta tese (Siqueira Neto et al., 2007).

3.3.2. Resultados referentes à proteína LaRBP38

3.3.2.1. Caracterização do gene *LaRBP38*

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene *LaRBP38* foram obtidos segundo descrito para obtenção dos iniciadores usados na amplificação do gene *LaRPA-1*. O gene *LaRBP38* amplificado foi então clonado e seqüenciado. A tradução das seqüências nucleotídicas obtidas do gene *LaRBP38* indicou a presença de ORF única. O gene *LaRBP38* também foi amplificado a partir de uma biblioteca de cDNAf gerada a partir de mRNA total, sugerindo que este gene é transcrito.

Comparações entre seqüências homólogas usando o programa Blast2p e Blastp (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) mostram que *LaRBP38* compartilha alta identidade com as seqüências de *RBP38* de diferentes tripanosomatídeos, conforme apresentado na Tabela III, e confirma que essa proteína parece ser exclusiva do grupo dos Kinetoplastida pois não existem similares nos bancos de dados de outros organismos (ex: humanos, levedura e plantas)

Tabela III – Conservação da proteína LaRBP38. Análise comparativa do alinhamento da seqüência de aminoácidos das proteínas LaRBP38, utilizando o programa BLASTp. Os valores representam a porcentagem de identidade obtida em cada alinhamento.

	Número de acesso no GenBank	LaRBP38
<i>Leishmania major</i>	CAJ04428	97 %
<i>Leishmania tarentolae</i>	AAO39844	93 %
<i>Leishmania infantum</i>	XP_001465768	97 %
<i>Trypanosoma cruzi</i>	AAQ63938	70 %
<i>Trypanosoma brucei</i>	XP_847107	69 %
<i>Homo sapiens</i>		-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		-
<i>Drosophyla melanogaster</i>		-
<i>Arabidopsis thaliana</i>		-
<i>Plasmodium falciparum</i>		-

Experimentos de “Southern blotting” permitiram verificar através da análise do perfil de hibridizações com a sonda *LaRBP38* que o gene *LaRBP38* está presente em baixo número de cópias ou cópia única no genoma de *L. amazonensis*. A Fig. 20A apresenta o perfil de hibridizações.

A análise do mapeamento cromossômico mostra que o gene de *LaRBP38* é hibridizado em um único cromossomo. A Fig. 20B demonstra que o gene *LaRBP38* se localiza em um cromossomo com aproximadamente 0,7 Mb (banda cromossômica 11). Este resultado corrobora ainda a hipótese de que este gene está presente provavelmente em cópia única no genoma de *L. amazonensis*. Além disso, uma busca no banco de dados de *L. major* confirmou que o gene *LaRBP38* está presente em única cópia no genoma dessa espécie.

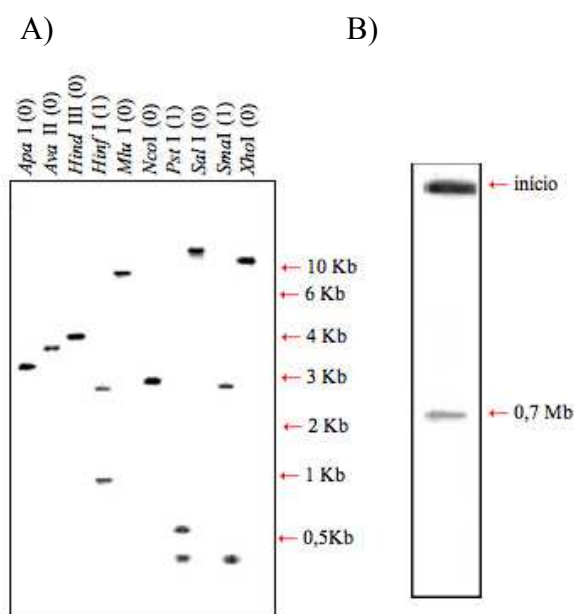


Figura 20: Organização genômica e mapeamento cromossômico do gene *LaRBP38*. Em A) DNA genômico de *L. amazonensis* foi digerido com *Apa*I (linha 1), *Ava*II (linha 2), *Hind*III (linha 3), *Hinf*I (linha 4), *Mlu*I (linha 5), *Nco*I (linha 6), *Pst*I (linha 7), *Sal*I (linha 8), *Sma*I (linha 9) e *Xho*I (linha 10), separado em gel de agarose 0,8% e transferido para membranas de nylon que foram hibridizadas sob condições de alta estringência com os fragmentos de *LaRBP38* marcados com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$. Os números entre parênteses apresentam a quantidade de sítios de restrição de cada enzima presentes na sequência do gene utilizado como sonda. Em B) bandas cromossômicas de *L. amazonensis* fracionadas por PFGE em gel de agarose 1,1% foram transferidas para membranas de nylon e hibridizadas com a sonda de *LaRBP38*.

3.3.2.2. A produção de LaRBP38 recombinante

O gene *LaRBP38* foi clonado no vetor pET-28a(+) de expressão protéica em sistema bacteriano, com o mapa representado na Fig. 21A. Para confirmar a clonagem foi realizada reação em cadeia de polimerase com oligonucleotídeos iniciadores específicos de *LaRbp38* e como molde da reação, foi utilizado o plasmídeo pET-28a(+) supostamente clonado com o gene *LaRBP38*. A Fig. 21B apresenta a confirmação da clonagem pela amplificação de produto na linha 1. A amplificação pode ser comparada ao controle positivo da reação realizada utilizando-se como molde um plasmídeo clonado com o cDNA de *LaRBP38*, presente na linha 2 da Fig. 21B. A linha 3 da Fig. 21C corresponde ao controle negativo da reação, realizada com o vetor pET-28a(+) sem inserto.

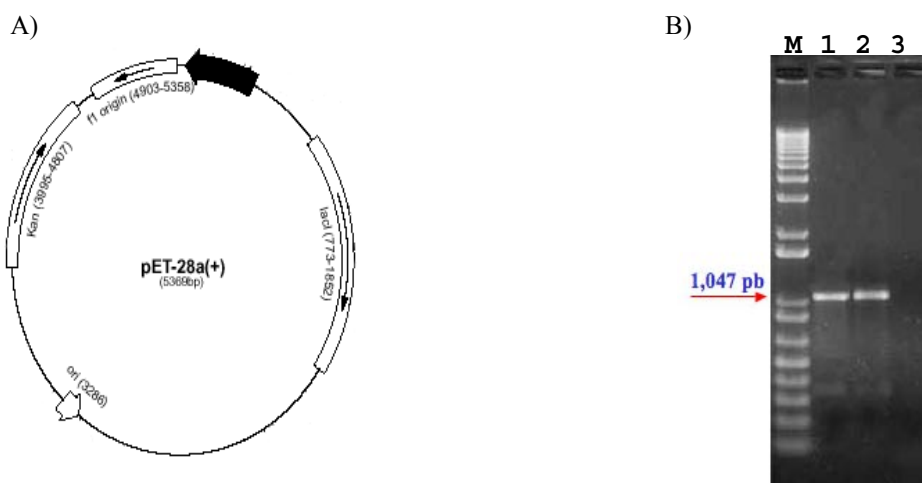


Figura 21: Clonagem de *LaRBP38* no vetor pET-28a(+) de expressão em bactéria. A) Mapa do plasmídeo pET-28a(+) destacando o marcador de seleção Kanamicina (Kan). Em B) gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio. A linha “M” apresenta o marcador de peso molecular (Ladder 1Kb Plus – Invitrogen). A linha 1, corresponde ao fragmento amplificado a partir do plasmídeo recombinante pET/LaRBP38. A linha 2 é o controle positivo de amplificação, onde foi utilizado como molde de reação, uma amostra de LaRBP38/cDNA clonado em plasmídeo TOPO. A linha 3, é o controle negativo da reação, realizada com DNA plasmidial sem o inserto.

Após confirmar a clonagem, bactérias competentes foram transformadas com o vetor pET-LaRBP38 para expressão da proteína recombinante. Após diversos testes padronizamos a

expressão da proteína em bactéria *E. coli* BL21 (DE3) pré-transformada com o vetor *Códon-Plus*-RP que codifica tRNAs com anti-códons raros para arginina e prolina.

A Fig. 22 corresponde ao perfil de expressão da proteína LaRBP38 em sistema bacteriano. Podemos observar comparando a linha 1 que corresponde ao extrato protéico de bactérias não induzidas para a expressão de LaRBP38 com as linhas 2, 3 e 4, que correspondem aos extratos protéicos coletados nas primeiras 3 horas após a indução da expressão. Por este resultado podemos verificar que a proteína recombinante, que é a banda que não está presente na linha 1, já é expressa na primeira hora após a indução, e aumenta pouco em quantidade nas duas horas subseqüentes. As linhas 5 e 6 correspondem respectivamente às frações de sobrenadante e precipitado de um extrato protéico 5 horas após a indução. A presença da proteína recombinante na fração precipitada (linha 6) indica que a proteína LaRBP38 é expressa na forma insolúvel, presente em corpúsculos de inclusão.

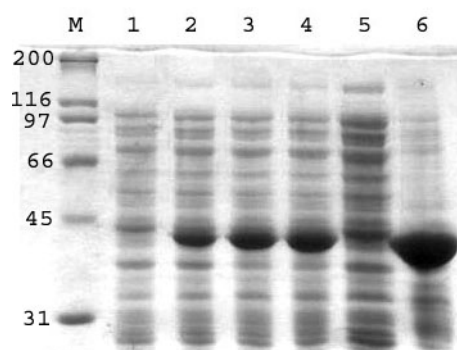


Figura 22: SDS-PAGE corado com coomassie-blue apresentando o perfil de expressão da proteína LaRBP38 recombinante. Na linha M) está o marcador de peso molecular Broad Range da BioRad com os valores em kDa das bandas indicadas na coluna da esquerda. Linha 1) extrato protéico de bactérias em cultura clonadas com o vetor de expressão de LaRBP38, num momento anterior à indução da expressão. Linhas 2, 3 e 4) extratos de bactérias da mesma cultura de bactérias da linha 1, coletados 1, 2 e 3 horas após a indução da expressão respectivamente. Linha 5) fração solúvel do extrato bacteriano coletadas 5 horas após a indução da expressão. Linha 6) fração insolúvel do mesmo extrato.

3.3.2.3. A proteína LaRBP38 é expressa em *L. amazonensis*

Um imunoensaio (Western blotting) utilizando soro de coelho imunizado, contendo anticorpos anti-LaRBP38, foi realizado para confirmar se a proteína LaRBP38 era expressa em *L. amazonensis*. Para o imunoensaio foi produzido um extrato protéico a partir de uma cultura de *L. amazonensis*. Este extrato protéico foi resolvido em um SDS-PAGE e transferido para uma membrana de nitrocelulose. Sobre a membrana foi realizado o Western blotting. O resultado do ensaio de imunodeteção está representado na Fig. 23. A linha 1 da figura contém o extrato protéico de *L. amazonensis* enquanto a linha 2 contém a proteína LaRBP38 recombinante. O ensaio foi revelado com o soro do coelho com anticorpo anti-LaRBP38. A presença de uma banda de ~38 kDa que é revelada pelo anticorpo tanto no extrato contendo proteína nativa quanto no extrato contendo proteína recombinante, demonstra a especificidade do anti-LaRBP38. Esta detecção confirma que a proteína LaRBP38 é expressa em *L. amazonensis*. Membranas reveladas com o soro coletado do mesmo coelho antes da imunização foram usadas como controle e como forma de validação da especificidade do anticorpo produzido (dados não mostrados).

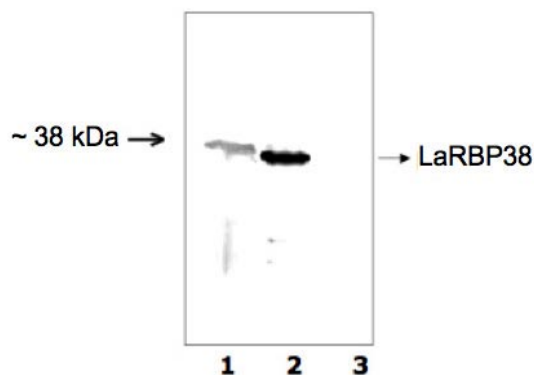


Figura 23: Imunodeteção da proteína LaRBP38 em extrato de *L. amazonensis*. Ensaio de Western blotting em que a linha 1 apresenta um extrato de proteína nativas de *L. amazonensis*, a linha 2 apresenta um extrato bacteriano com a proteína LaRBP38 recombinante sendo expressa, e a linha 3 apresenta um extrato bacteriano com expressão não induzida, como controle do ensaio.

3.3.2.4. LaRBP38 se associa *in vivo* ao DNA telomérico de *L. amazonensis*

Para determinar se a proteína LaRBP38 se associa *in vivo* ao DNA telomérico foram realizados ensaios de imunoprecipitação utilizando-se formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase exponencial de crescimento. O DNA imunoprecipitado que era parte da cromatina obtida foi transferido para uma membrana e hibridizado com diferentes sondas a fim de verificar se havia DNA telomérico ou não na cromatina imunoprecipitada. A Fig. 24 apresenta o perfil de hibridização da membrana com 3 sondas diferentes (com seqüências na Tabela I): Tell (sonda de telômeros de *Leishmania*), ScTel (sonda de telômeros de *S. cerevisiae*) e GT-rich (sonda rica em repetições GT). Podemos observar que LaRBP38 imunoprecipita com DNA telomérico da fita rica em G de *Leishmania*, e também com outros DNAs teloméricos. As imunoprecipitações realizadas com anticorpo anti-LaRPA-1 foram utilizadas como controle positivo de hibridização, visto que o padrão de hibridização neste caso já era conhecido. Os controles negativos sem anticorpo (Sem Ac) e com o soro pré-imune (Pre-Im) não apresentaram perfil de hibridização significativa, conforme esperado. Desta forma, o perfil de hibridização apresentado na Fig. 24 confirma a interação *in vivo* da proteína LaRBP38 com o DNA telomérico.

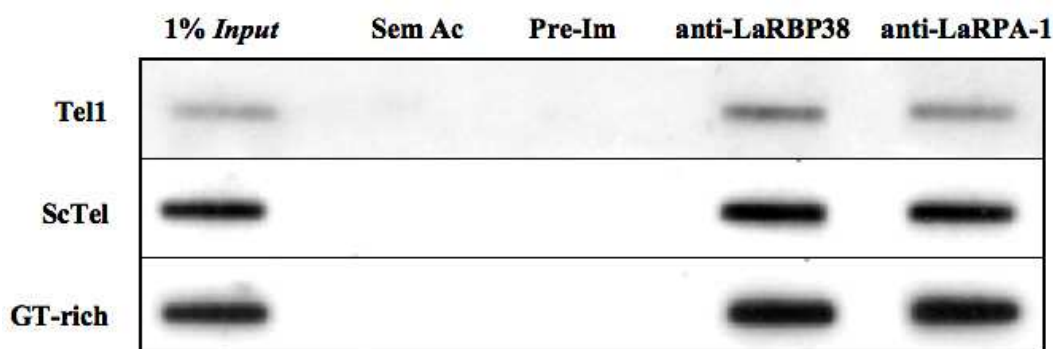


Figura 24: Imunoprecipitação de cromatina. Ensaio realizado com anticorpos anti-LaRBP38 e anti-LaRPA-1. Controles do experimento foram feito com soro pré-imune e sem soro. 1% do DNA total utilizado em cada ensaio e as amostras de DNA imunoprecipitados foram transferidas para membrana e hibridizadas com as sondas descritas.

3.3.2.5. Localização subcelular da proteína LaRBP38

Para se determinar a localização subcelular da proteína LaRBP38 foram realizados ensaios de imunofluorescência. Nestes ensaios são utilizados anticorpos secundários conjugados com fluorocromo AlexaFluor 488 (Molecular Probes) que reconhecem e se ligam ao anticorpo primário, responsável pela detecção da proteína de interesse. A Fig. 25 apresenta na coluna da esquerda a marcação com DAPI, evidenciando o núcleo e o cinetoplasto das células. Na coluna central, podemos observar um padrão de distribuição para as proteínas LaRBP38 e na coluna da direita podemos verificar a localização de LaRBP38 polarizada no cinetoplasto. Nas condições utilizadas para o experimento, não observamos células apresentando LaRBP38 localizada no núcleo.

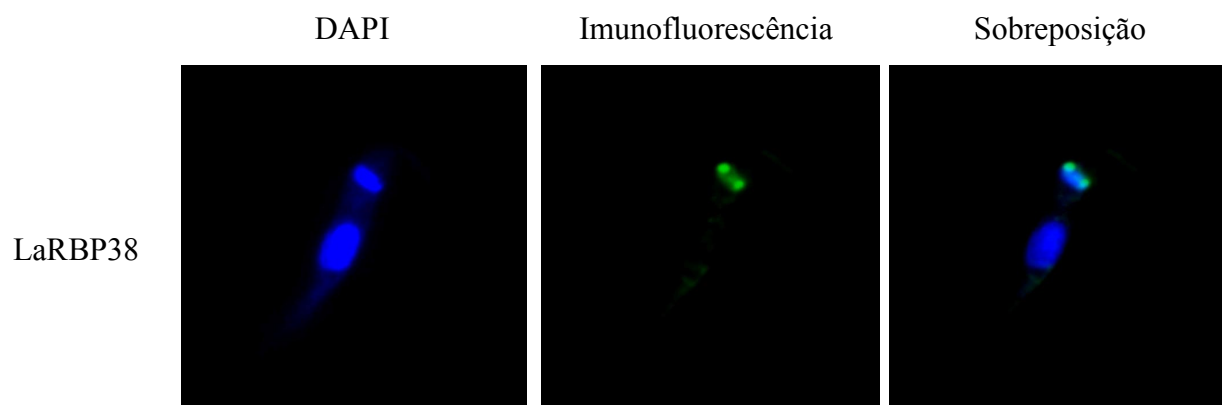


Figura 25: Ensaios de imunofluorescência para detecção e localização da proteína LaRBP38. Na coluna da esquerda estão representadas as imagens obtidas com a marcação de ácidos nucleicos pelo DAPI. Na coluna central as imagens representam a reação entre anticorpo secundário e o anticorpo primário anti-LaRBP38. Na coluna da direita está representada a sobreposição das imagens para se determinar a localização subcelular da proteína.

4. DISCUSSÃO

Os telômeros são complexos dinâmicos nas extremidades dos cromossomos dos eucariotos que são essenciais na manutenção da estabilidade genômica (Blackburn, 2000). As proteínas que se associam aos telômeros são as grandes responsáveis por determinar a dinâmica destes complexos (Smogorzewska & de Lange, 2004). Por estas razões faz-se importante compreender os mecanismos que controlam os telômeros através das proteínas que o compõem, das interações entre elas, e das associações com o DNA telomérico. Uma vez conhecidas estas informações seremos capazes de interferir nas células desestabilizando seus telômeros, e conseqüentemente induzir instabilidade genômica que leve as células à senescência e morte celular (Shay, 2003, Blackburn et al., 2006). Este tipo de interferência terá importância na interrupção do crescimento de parasitas no organismo hospedeiro.

Há uma década não se conhecia nenhuma proteína que se associasse aos telômeros de *Leishmania*. Como ilustra a Fig. 12 desta tese, diversas proteínas já foram identificadas e já é possível estabelecer um panorama parcial da constituição da cromatina telomérica de *L. amazonensis*. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar as proteínas que se associam a porção simples-fita rica em G dos telômeros deste parasita. A continuação dos estudos determinará a função destas proteínas, para que, no futuro, possa se escolher entre elas alvos potenciais para o desenvolvimento de terapias antiparasitárias.

4.1. A possível função de LaRPA-1 nos telômeros de *Leishmania*

A proteína RPA é largamente encontrada dentre os organismos eucariotos desde os mais primitivos, como protozoários e fungos, até mamíferos (Brown et al., 1992, Ono et al., 2003, Salas et al., 2006). Desempenha nas células importantes funções relacionadas à maquinaria de recombinação e reparo do DNA, replicação e, ainda, proteção e regulação telomérica (Ono et al., 2003, Dahlén et al., 2003, Schramke et al., 2004).

Demonstramos neste trabalho que a proteína LaRPA-1 de *L. amazonensis*, com ~51 kDa, é menor que as RPA-1 da maioria dos eucariotos, que apresentam massa aproximada de 70 kDa. A diferença no tamanho destas proteínas está na ausência do domínio RPA-70N nas RPA-1 de vários protozoários, incluindo as *Leishmanias* (Fig. 1 do artigo do item 3.1 desta tese). Este domínio é responsável pela interação do complexo trimérico RPA com as maquinarias de reparo por recombinação e transcrição (Jacobs et al., 1999). As RPA-1 de outros protozoários Apicomplexa e Kinetoplastida assemelham-se à RPA-1 de *Leishmania*. É o caso da RPA-1 de *Crithidia fasciculata* (Brown et al., 1992), da RPA-1 de *Cryptosporidium parvum* (Zhu et al., 1999) e da RPA-1 de *Plasmodium falciparum* (Voss et al., 2002). Com isto, poderíamos imaginar que nestes organismos, a proteína RPA não teria função nas maquinarias de recombinação e reparo, já que a subunidade maior (RPA-1) não apresenta o domínio de interação com proteínas destas maquinarias. Esta diferença sugere que, nestes grupos de protozoários, a proteína RPA-1 pode atuar apenas nos telômeros.

Sabemos ainda que as subunidades RPA-2 e RPA-3 não são co-purificadas com a RPA-1 a partir dos telômeros de *L. amazonensis* (Fernández et al., 2004). No entanto, seqüências homólogas a estas subunidades estão catalogadas como ORFs no genoma deste parasita (para detalhes consulte o site <http://www.genedb.org/genedb/leish/>). Sugere-se então que a proteína LaRPA-1 atua de forma isolada nos telômeros de *L. amazonensis*, sendo porém, possível que ela funcione como um trímero em outras maquinarias da célula, a exemplo da RPA de *C. fasciculata* (Brown et al., 1992). Em *C. fasciculata*, assim como em humanos, a RPA foi encontrada como um trímero que liga DNAsf através da subunidade maior (RPA-1), comprovando um alto grau de conservação entre as RPA na maquinaria de replicação de organismos divergentes.

Buscas no genoma de *Leishmania* revelaram que não há seqüências homólogas às dos genes da família TEP, que codificam as proteínas que se ligam ao DNAsf telomérico: CDC13, POT1 e TEBP (Croy & Wuttke, 2006). A LaRPA-1 entretanto compartilha com as proteínas da família TEP, o domínio OB-fold de ligação ao DNAsf (Fig. 2 do artigo do item 3.1 desta tese).

Assim sendo, é possível que a proteína LaRPA-1 identificada *in vivo* em associação com os telômeros de *L. amazonensis* como demonstrado neste trabalho (Fig. 4 do artigo do item 3.1 desta tese), pode ser considerada o homólogo funcional destas proteína. Se isto for confirmado ela deve cumprir duas funções essencialmente na simples fita telomérica deste organismo:

1) A primeira função estaria relacionada ao papel de recrutar a telomerase para os terminais cromossômicos no momento da elongação telomérica, conforme já descrito para a RPA de outros organismos (Schramke et al., 2004).

2) A segunda função seria a de proteger os telômeros de *L. amazonensis*, permanecendo ligada à simples fita telomérica e impedindo fusões terminais, assim como o reconhecimento da simples fita pela maquinaria de reparo por recombinação homóloga.

Em leveduras, as proteínas parceiras de CDC13 nos telômeros, Stn1 e Ten1 foram recentemente classificadas como proteínas homólogas às subunidades RPA-2 e RPA-3 (Gao et al., 2007), sendo que as proteínas Stn1 e RPA-2, assim como Ten1 e RPA-3, apresentam características semelhantes, como tamanho, presença e posição de domínios OB-fold. Os autores propõem que o trímero CDC13-Stn1-Ten1 funcione como uma *RPA-like*, atuando de forma semelhante a RPA. Estas suposições indicam que os mecanismos de manutenção dos telômeros são conservados dentre as espécies.

Para confirmar estas suposições será necessário entretanto, o estudo funcional da proteína LaRPA-1 em *Leishmania*. Alguns pontos fundamentais para se conhecer o papel desta proteína nos parasitas seriam determinar se a RPA-1 participa ou não das maquinarias não teloméricas (reparo por recombinação, replicação, transcrição, etc.) e ainda verificar quais são as proteínas que interagem diretamente com RPA-1 durante o ciclo celular. Desta forma poderíamos melhor entender a importância desta proteína para a manutenção dos telômeros e para a viabilidade do parasita.

4.2. LaRBP38 pode ser uma proteína multifuncional e atuar em diferentes organelas

A proteína RBP38 foi inicialmente descrita como uma proteína que estabiliza moléculas de RNA no cinetoplasto de *L. tarentolae* e *T. brucei* (Sbicego et al., 2003) e mais recentemente teve seu papel descrito na maquinaria de replicação de minicírculos do kDNA de *T. brucei* (Liu et al., 2006). Algumas evidências de que RBP38 poderia ser também uma proteína com função nuclear foram previamente apresentadas nos trabalhos de Duhagon e colaboradores (2003) e Fernández et al. (2004). Duhagon et al. (2003) demonstraram a existência de uma proteína de 38kDa em extratos nucleares de *T. cruzi*, denominada Tc38. Esta proteína apresentava alta identidade e similaridade com a RBP38 e era capaz de se associar *in vitro* às seqüências poli dTdG encontradas em regiões intergênicas neste parasita. No ano seguinte, Fernández et al. (2004) identificaram em extratos totais e nucleares de *L. amazonensis*, uma proteína de 38 kDa que era capaz de ser purificada em colunas de afinidade ao DNAsf rico em G dos telômeros do parasita. A proteína foi identificada por espectrometria de massa e seqüenciamento *de novo* de peptídeos tripticos, como sendo RBP38. Ensaios de interação proteína-DNA e de competição demonstraram que LaRBP38 (*L. amazonensis* RBP38) era capaz interagir com a fita telomérica rica em G dos telômeros de *L. amazonensis* (Lira et al., 2007a). Neste trabalho mostramos que LaRBP38 também é capaz de interagir *in vivo* com a fita telomérica rica em G (Fig.24 desta tese). Mais recentemente, Lira et al., (2007a) comprovaram que RBP38 interage tanto com DNA telomérico e DNA rico em GT na forma de dupla fita, quanto com o kDNA. Juntos, esses resultados sugerem que RBP38 deve cumprir funções tanto no núcleo quanto no cinetoplasto.

No entanto, ensaios de imunofluorescência realizados com a proteína p38 de *T. brucei* expressa em fusão com GFP (Liu et al., 2006) ou imunofluorescência indireta utilizando anticorpo anti-LaRBP38 (Fig. 25 desta tese) mostraram que RBP38 está presente exclusivamente no cinetoplasto. Como estes resultados são aparentemente controversos, pode-se levantar algumas hipóteses para explicá-los. Uma das hipóteses é que a proteína RBP38 poderia apresentar 2 isoformas em *T. brucei*, uma com função nuclear e outra com função no cinetoplasto e assim, Liu e colaboradores (2006) teriam estudado apenas a isoforma presente no cinetoplasto. Isto se explicaria pelo fato de que já existem evidências mostrando que outras proteínas em *T. brucei*

têm o mesmo comportamento. Um bom exemplo é a Topoisomerase II, que em *T. brucei* apresenta dois genes codificando duas isoformas as quais têm função no núcleo e no cinetoplasto (Kulikowicz & Shapiro, 2006). Já em *Leishmania* e *T. cruzi* a mesma proteína é codificada por um único gene (Das et al., 2001, Das et al., 2006). No caso da LaRBP38, especulamos que apenas uma proteína teria função mitocondrial e nuclear, o que estaria de acordo com os resultados obtidos por Lira e colaboradores (2007a) que demonstraram que LaRBP38 se associa *in vivo* tanto com o DNA telomérico quando com o kDNA.

A não visualização de RBP38 no núcleo dos parasitas poderia ser explicado ou pelo fato da proteína estar em transito ou de ser menos requerida para suas funções nucleares apresentando-se nesta organela em quantidades abaixo do limiar mínimo de detecção por técnicas de microscopia. Este fato acontece, por exemplo, com a proteína TzCRK1 de *T. brucei*, onde a proteína ocorre em pequenas quantidades no núcleo e no citoplasma, mas em grande quantidade no cinetoplasto (Gómez et al., 2006). Neste caso, a visualização de LaRBP38 no núcleo só seria possível através de técnicas mais refinadas de microscopia ou de superexpressão.

Desta forma, é de total interesse continuar os estudos para se desvendar as possíveis funções de LaRBP38 nas duas organelas. Para isto, e como no caso da LaRPA-1 seria interessante se determinar quais as proteínas que interagem com LaRBP38. Sabemos que se trata de uma proteína exclusiva entre o grupo dos tripanosomatídeos e que é essencial para a viabilidade destes organismos (Liu e colaboradores, 2006). Estes fatos já credenciam a RBP38 como um alvo potencial para desenvolvimento de terapia antiparasitária. Porém, novos estudos são necessários para compreender de maneira mais precisa, qual o papel da RBP38 na biologia destes parasitas.

5. CONCLUSÕES

- Os genes que codificam as proteínas LaRPA-1 e LaRBP38 estão presentes no genoma de *L. amazonensis* em um baixo número de cópias ou mais provavelmente em cópia única. Estão localizados nas bandas cromossômicas com tamanhos de 1,3 Mb (banda cromossômica 20) e 0,7 Mb (banda cromossômica 11), respectivamente.
- A proteína LaRPA-1, assim como os organismos protozoários de maneira geral, é menor que as RPA-1 da maioria dos eucariotos, não apresentando o domínio N-terminal (RPA-70N) que é responsável pela interação da proteína com as maquinarias de recombinação e reparo do DNA celular.
- As proteínas LaRBP38 e LaRPA-1 são expressas em *L. amazonensis* conforme observado por Western blotting utilizando-se anticorpos específicos para a imunodeteção destas proteínas em extratos protéicos do parasita.
- Ensaio de imunoprecipitação de cromatina comprovam que tanto a proteína LaRBP38 quanto a LaRPA-1 interagem *in vivo* com o DNA telomérico de *L. amazonensis* e também com outros DNAs ricos em G.
- Não foi possível se detectar LaRBP38 no núcleo de *Leishmania* por ensaios de imunofluorescência indireta.
- A proteína LaRPA-1 interage com o DNAsf através de um domínio OB-fold localizado em sua região N-terminal. Um mutante deletional contendo apenas o domínio de ligação interage mais fortemente com o DNA do que a proteína inteira.

- A co-localização nuclear da proteína LaRPA-1 com o DNA telomérico, visualizada através da combinação das técnicas de imunofluorescência e de hibridização *in situ*, corrobora a hipótese de que esta proteína se associa *in vivo* com os telômeros de *L. amazonensis*.

6. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA COMPLEMENTAR

6.1. Artigos produzidos em parte com resultados desta tese

6.1.1 Artigo II: *Biochem Biophys Res Commun.* (2007) 358:854-60.

LaRbp38: a *Leishmania amazonensis* protein that binds nuclear and kinetoplast DNAs

C.B.B. Lira, J.L. Siqueira Neto, M.A. Giardini, F.V. Winck, C.H.I. Ramos and M.I.N. Cano*

Resumo:

Leishmania amazonensis causa um amplo espectro de leishmanioses. Não há vacinas ou tratamento adequado para as leishmanioses, embora haja um interesse considerável na identificação de novos alvos para drogas anti-leishmania. O papel central das proteínas ligantes de telômeros na manutenção celular faz dessas proteínas alvos em potencial para o desenvolvimento de novas drogas. Neste trabalho, utilizamos uma combinação de purificações por cromatografia para examinar as proteínas de *L. amazonensis* no intuito de encontrar moléculas capazes de se ligar ao DNA telomérico dupla-fita. Esta iniciativa resultou na purificação de um polipeptídeo de 38 kDa identificado por espectrometria de massa como sendo Rbp38, uma proteína de tripanossomatídeos que tinha sido mostrada previamente estabilizando RNA mitocondrial e se associando com DNAs do núcleo e do cinetoplasto. Ensaios de "Western blotting" e de "supershift" confirmaram a identidade da proteína como sendo LaRbp38. Ensaios de competição e de imunoprecipitação de cromatina confirmaram que LaRbp38 interagiu com os DNAs do cinetoplasto e do núcleo *in vivo* e sugeriram que a LaRbp38 pode ter dupla localização celular e mais de uma função.

Telomere Biology of Trypanosomatids: beginning to answer some questions

Cristina B.B. Lira, Miriam A. Giardini, Jair L. Siqueira Neto, Fábio F. Conte, Maria Isabel N. Cano*

Resumo:

Estudos sobre a estrutura e a manutenção dos telômeros de tripanossomatídeos têm gerado informações mais acuradas sobre a origem evolucionária e a conservação de alguns dos componentes teloméricos compartilhados por tripanosomas e vertebrados. Por exemplo, os telômeros de tripanossomatídeos são mantidos pela telomerase e compreendem as repetições canônicas TTAGGG, as quais em *Trypanosoma brucei* podem formar "t-loops". Contudo, a cromatina telomérica dos tripanossomatídeos é composta por proteínas específicas de cada organismo e também por outras proteínas que partilham pouca similaridade de sequência com os vertebrados. Como os mecanismos de manutenção dos telômeros são essenciais para a estabilidade do genoma, nós propomos que as características particulares demonstradas pela cromatina telomérica dos tripanosomas abrigam a chave para o desenho de drogas anti-parasitárias.

6.2. Artigos em co-autoria

6.2.1. Artigo IV: *Parasitol Res.* (2006) 98:447-54

The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: gene cloning and characterization.

Giardini, M.A., Lira, C.B., Conte, F.F., Camillo, L.R., Siqueira Neto, J.L., Ramos, C.H., Cano, M.I.*

Resumo:

O gene da telomerase de *Leishmania amazonensis* foi clonado por uma estratégia baseada em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores desenhados a partir de uma sequência de *Leishmania major* que compartilhava similaridades com os motivos conservados das telomerases. Os genes das outras três espécies foram clonados com propósitos comparativos. O alinhamento múltiplo das sequências através do programa ClustalW demonstrou que as telomerases de *Leishmania* apresentam muito mais homologia entre elas do que com as proteínas de outros kinetoplastídeos e eucariotos. Experimentos de caracterização indicaram que o gene putativo da telomerase de *Leishmania* estava provavelmente em cópia única e localizado nos maiores cromossomos. Um único transcrito de RNA mensageiro foi encontrado nos promastigotas. Análises filogenéticas sugerem que a telomerase de *Leishmania* pode representar um elo de ligação entre os ramos mais antigos e os novos ramos das telomerases.

6.2.2. Artigo V: *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2007) Em fase de impressão.

LaTBP1: A *Leishmania amazonensis* DNA-binding protein that associates *in vivo* with telomeres and GT-rich DNA using a MYB-like domain

Cristina B.B. Lira, Jair L. Siqueira Neto, Letícia Khater, Tiago C. Cagliari, Luis A. Peroni, José R. R. Reis, Carlos H.I. Ramos and Maria I.N. Cano*

Proteínas que se ligam ao DNA telomérico são componentes celulares cruciais que regulam a estrutura e a função dos telômeros dos eucariotos. Estas proteínas poderiam ser consideradas bons alvos para terapia antiparasitária devido à importância que exercem sobre a estabilidade dos cromossomos e a viabilidade celular. *Leishmania* e outros tripanosomatídeos são responsáveis por uma variedade de doenças que são graves problemas de saúde pública. No entanto, até o momento, apenas um candidato à proteína que se associa à dupla-fita telomérica foi identificado nos tripanosomatídeos: um homólogo da proteína TRF2 de humanos. Este trabalho apresenta um novo candidato: LaTBP1 (*Leishmania amazonensis* Telomeric Binding Protein 1), que se associa ao DNA dupla-fita telomérico e com DNA satélite rico em GT. LaTBP1 é homólogo a uma proteína hiPOT1ética de *L. major* que possui um domínio semelhante ao domínio Myb, uma característica compartilhada pela maioria das proteínas ligantes de dupla-fita telomérica. Ensaio de ligação utilizando LaTBP1 recombinante e mutantes truncados demonstraram que esta proteína se liga ao DNA através de um domínio Myb posicionado na porção central da proteína. Ensaio de competição e imunoprecipitação da cromatina confirmaram a especificidade da LaTBP1 pelo DNA telomérico e por DNAs ricos em GT. Experimentos de espectroscopia de fluorescência com emissão intrínseca e extrínseca indicaram que este domínio semelhante a um Myb possui uma cavidade hidrofóbica conservada envolvida na atividade de ligação ao DNA, e localizada no único resíduo de triptofano da proteína. Estes resultados sugerem fortemente que a LaTBP1 é uma nova proteína que se liga ao DNA telomérico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. trad. por VEIGA, A.B.G. *Biologia Molecular da Célula, Artmed Editora* 4.ed., p 262-263.
- ANDERSON, E.M., HALSEY, W.A., WUTTKE, D.S. (2002) Delineation of the high-affinity single-stranded telomeric DNA-binding domain of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc13. *Nucleic Acids Res.* 30:4305-13.
- ANDERSON, E.M., HALSEY, W.A., WUTTKE, D.S. (2003) Site-directed mutagenesis reveals the thermodynamic requirements for single-stranded DNA recognition by the telomere-binding protein Cdc13. *Biochemistry* 42:3751-8.
- BAE, S.H., BAE, K.H., KIM, J.A., SEO, Y.S. (2001) RPA governs endonuclease switching during processing of Okazaki fragments in eukaryotes. *Nature* 412:456-61.
- BASTIEN, P., BLAINEAU, C., PAGES, M. (1992) *Leishmania*: sex, lies and karyotype. *Parasitol Today* 8:174-7.
- BAUMANN, P., CECHE, T.R. (2001) Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* 292, 1171-1175.
- BEVERLEY, S.M. (1991) Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol.* 45:417-44.
- BIANCHI, A., NEGRINI, S., SHORE, D. (2004) Delivery of yeast telomerase to a DNA break depends on the recruitment functions of Cdc13 and Est1. *Mol Cell.* 16:139-46.
- BIANCHI, A., SHORE, D. (2007) Early replication of short telomeres in budding yeast. *Cell* 128:1051-62.
- BLACKBURN, E.H. (2000). Telomere states and cell fates. *Nature* 408: 53-56.
- BLACKBURN, E.H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106: 661-673.
- BLACKBURN, E.H., GREIDER, C.W., SZOSTAK, J.W. (2006) Telomeres and telomerase: the path from maize, *Tetrahymena* and yeast to human cancer and aging. *Nat Med.* 12:1133-8.
- BOCHKAREV, A., BOCHKAREVA, E. (2004) From RPA to BRCA2: lessons from single-stranded DNA binding by the OB-fold. *Curr Opin Struct Biol.* 14:36-42.

- BOCHKAREVA, E., KOROLEV, S., LEES-MILLER, S.P., BOCHKAREV, A. (2002) Structure of the RPA trimerization core and its role in the multistep DNA-binding mechanism of RPA. *EMBO J.* 21:1855-63.
- BOCHKAREVA, E., BELEGU, V., KOROLEV, S., BOCHKAREV, A. (2001) Structure of the major single-stranded DNA-binding domain of replication protein A suggests a dynamic mechanism for DNA binding. *EMBO J.* 20:612-8.
- BOOTH, C., GRIFFITH, E., BRADY, G., LYDALL, D. (2001) Quantitative amplification of single-stranded DNA (QAOS) demonstrates that cdc13-1 mutants generate ssDNA in a telomere to centromere direction. *Nucleic Acids Res.* 29:4414-22.
- BROWN, G.W., MELENDY, T.E., RAY, D.S. (1992) Conservation of structure and function of DNA replication protein A in the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10227-31.
- BUNCH, J.T., BAE, N.S., LEONARDI, J., BAUMANN, P. (2005) Distinct requirements for Pot1 in limiting telomere length and maintaining chromosome stability. *Mol Cell Biol.* 25:5567-78.
- CANO, M.I. (2001). Telomere biology of trypanosomatids: more questions than answers. *Trends Parasitol.* 17: 425-429.
- CANO, M.I., DUNGAN, J.M., AGABIAN, N., BLACKBURN, E.H. (1999) Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3616-21.
- CHAHWAN, C., NAKAMURA, T.M., SIVAKUMAR, S., RUSSELL, P., RHIND, N. The fission yeast Rad32 (Mre11)-Rad50-Nbs1 complex is required for the S-phase DNA damage checkpoint. *Mol Cell Biol.* 23:6564-73.
- CHANCE, M.L., PETERS, W., SHCHORY, L. (1974) Biochemical taxonomy of *Leishmania*. I. Observations on DNA. *Ann Trop Med Parasitol.* 68:307-16.
- CHANDRA, A., HUGHES, T.R., NUGENT, C.I., LUNDBLAD, V. (2001) Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev.* 15:404-14.
- COLGIN, L.M., BARAN, K., BAUMANN, P., CECH, T.R., REDDEL, R.R. (2003) Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase. *Curr Biol.* 13:942-6.

- CONTE, F.F., CANO, M.I. (2005). Genomic organization of telomeric and subtelomeric sequences of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Int J Parasitol.* 35:1435-43.
- CROY, J.E., WUTTKE, D.S. (2006) Themes in ssDNA recognition by telomere-end protection proteins. *Trends Biochem Sci.* 31:516-25.
- CRUZ, I., NIETO, J., MORENO, J., CANAVATE, C., DESJEUX, P., ALVAR, J. (2006) *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res.* 123:357-88.
- DAHLEN, M., SUNNERHAGEN, P., WANG, T.S. (2003) Replication proteins influence the maintenance of telomere length and telomerase protein stability. *Mol Cell Biol.* 23:3031-42.
- DAS A, DASGUPTA A, SHARMA S, GHOSH M, SENGUPTA T, BANDOPADHYAY S, MAJUMDER HK. (2001) Characterisation of the gene encoding type II DNA topoisomerase from *Leishmania donovani*: a key molecular target in antileishmanial therapy. *Nucleic Acids Res.* 29:1844-51.
- DAS, B.B., SENGUPTA, T., GANGULY, A., MAJUMDER, H.K. (2006) Topoisomerases of kinetoplastid parasites: why so fascinating? *Mol Microbiol.* 62:917-27.
- DE LANGE, T. (2002) Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 21: 532-540.
- DE LANGE, T. (2004) T-loops and the origin of telomeres. *Nature Reviews* 5: 323-329.
- DE LANGE, T. (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telômeros. *Genes & Development* 19:2100-2110.
- DMITRIEV, P.V., PETROV, A.V., DONTSOVA, O.A. (2003) Yeast telosome complex: components and their functions. *Biochemistry* 68:718-34.
- DREESEN, O., CROSS, G.A. (2006) Telomerase-independent stabilization of short telomeres in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* 26:4911-4919.
- DREESEN, O., LI, B., CROSS, G.A. (2007) Telomere structure and function in trypanosomes: a proposal. *Nature Reviews Microbiology* 5:70-75.

- DUHAGON, M.A., DALLAGIOVANNA, B., CIGANDA, M., RUYECHAN, W., WILLIAMS, N., GARAT, B. (2003) A novel type of single-stranded nucleic acid binding protein recognizing a highly frequent motif in the intergenic regions of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309: 183-188.
- DUHAGON, M.A., DALLAGIOVANNA, B., GARAT, B. (2001) Unusual features of poly[dT-dG] _ [dC-dA] stretches in CDS-flanking regions of *Trypanosoma cruzi* genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287:98-103.
- EBERT, F. (1987) Isoenzyme studies on Leishmania stocks from Peru by ultrathin-layer isoelectrofocusing. *Trop Med Parasitol.* 38:37-40
- EVANS, S. & LUNDBLAD, V. (1999). Est1 and cdc 13 as comediators of telomerase access. *Science* 286: 117-120.
- FANG, G., CECH, T.R. (1993) The beta subunit of *Oxytricha* telomere binding protein promotes G-quartet formation by telomeric DNA. *Cell*, 74:875-885.
- FANG, G., GRAY, J.T., CECH, T.R. (1993) *Oxytricha* telomere-binding protein: separable DNA-binding and dimerization domains of the alpha-subunit. *Genes Dev.* 7:870-82.
- FERNÁNDEZ, M.F., CASTELLARI, R.R., CONTE, F.F., GOZZO, F.C., SABINO, A.A., PINHEIRO, H., NOVELLO, J.C., EBERLIN, M.N., CANO, M.I. (2004) Identification of three proteins that associate in vitro with the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* G-rich telomeric strand. *Eur J Biochem*, 271:3050-63.
- FROELICH-AMMON, S.J., DICKINSON, B.A., BEVILACQUA, J.M., SCHULTZ, S.C., CECH, T.R. (1998) Modulation of telomerase activity by telomere DNA-binding proteins in *Oxytricha*. *Genes Dev.* 12:1504-14.
- FU, G., BARKER, D.C. (1998) Rapid cloning of telomere-associated sequence using primer-tagged amplification. *Biotechniques.* 24:386-90.
- GAO, H., CERVANTES, R.B., MANDELL, E.K., OTERO, J.H., LUNDBLAD, V. (2007) RPA-like proteins mediate yeast telomere function. *Nat Struct Mol Biol.* 14:208-14.
- GARVIK, B., CARSON, M., HARTWELL, L. (1995) Single-stranded DNA arising at telomeres in cdc13 mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol Cell Biol.* 15:6128-38.

- GIARDINI, M.A., LIRA, C.B., CONTE, F.F., CAMILLO, L.R., SIQUEIRA NETO, J.L., RAMOS, C.H., CANO, M.I. (2006) The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: gene cloning and characterization. *Parasitol Res.* 98:447-54.
- GOMEZ, E.B., SANTORI, M.I., LARIA, S., ENGEL, J.C., SWINDLE, J., EISEN, H., SZANKASI, P., TELLEZ-INON, M.T. (2001) Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Cdc2p-related protein kinase 1 and identification of three novel associating cyclins. *Mol Biochem Parasitol.* 113:97-108.
- GOTTSCHILING, D.E., ZAKIAN, V.A. (1986) Telomere proteins: specific recognition and protection of the natural termini of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Cell* 47:195-205.
- GRAY, J.T., CELANDER, D.W., PRICE, C.M., CECH, T.R. (1991) Cloning and expression of genes for the *Oxytricha* telomere-binding protein: specific subunit interactions in the telomeric complex. *Cell* 67:807-14.
- GREIDER, C.W. (2000) Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell* 97:419-22.
- GREIDER, C.W., BLACKBURN, E.H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337: 331-337
- GRIFFITH, J.D., COMEAU, L., ROSENFELD, S., STANSEL, R.M., BIANCHI, A., MOSS, H., DE LANGE T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97: 503-514.
- GUEVARA, P., PINTO-SANTÍNI, D., ROJAS, A., CRISANTE, G., AÑEZ, N., RAMIREZ, J. L. (2001) Green Fluorescent Protein-Tagged *Leishmania* in Phlebotomine Sand Flies. *J. Med. Entomol.* 38:39-43.
- HARRINGTON, L. (2005). Making the most of a little: dosage effects in eukaryotic telomere length maintenance. *Chromosome Res.* 13:493-504
- HARRIS, E., KROPP, G., BELLI, A., RODRIGUEZ, B., AGABIAN, N. (1998) Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol.* 36:1989-95.
- HENDERSON, E., BLACKBURN, E. (1993). An overhang 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol. Cell Biol.* 9: 345-348.

- HOCKEMEYER, D., SFEIR, A.J., SHAY, J.W., WRIGHT, W.E., DE LANGE, T. (2005) POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end. *EMBO J.* 24:2667-78.
- HORVATH, M.P., SCHULTZ, S.C. (2001) DNA G-quartets in a 1.86 Å resolution structure of an *Oxytricha nova* telomeric protein-DNA complex. *J Mol Biol.* 310:367-77.
- HORVATH, M.P., SCHWEIKER, V.L., BEVILACQUA, J.M., RUGGLES, J.A., SCHULTZ, S.C. (1998) Crystal structure of the *Oxytricha nova* telomere end binding protein complexed with single strand DNA. *Cell* 95:963-74.
- IVENS, A.C., *et al.* (*genome*) (2005). The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. *Science* 309: 436-442.
- JACOBS, D.M., LIPTON, A.S., ISERN, N.G., DAUGHDRILL, G.W., LOWRY, D.F., GOMES, X., WOLD, M.S. (1999) Human replication protein A: global fold of the N-terminal RPA-70 domain reveals a basic cleft and flexible C-terminal linker. *J Biomol NMR.* 14:321-31.
- JOHNSTON, D., BLAXTER, M., DEGRAVE, W., FOSTER, J., IVENS, A., MELVILLE, S. (1999). Genomics and the biology of parasites. *BioEssays* 21:131-147.
- JONSSON, F., POSTBERG, J., SCHAFFITZEL, C., LIPPS, H. J. (2002) Organization of the macronuclear gene-sized pieces of stichotrichous ciliates into a higher order structure via telomere-matrix interactions. *Chromosome Res.* 10:445-53.
- KEDZIERSKI, L., ZHU, Y., HANDMAN, E. (2006) Leishmania vaccines: progress and problems. *Parasitology.* 133 Suppl:S87-112.
- KIBE, T., ONO, Y., SATO, K., UENO, M. (2007) Fission Yeast Taz1 and RPA Are Synergistically Required to Prevent Rapid Telomere Loss. *Mol Biol Cell* [Epub ahead of print]
- KLOBUTCHER, L.A., SWANTON, M.T., DONINI, P., PRESCOTT, D.M. (1981) All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:3015-9.
- KONIG, P., RHODES, D. (1997) Recognition of telomeric DNA. *Trends Biochem Sci.* 22:43-7.

- KULIKOWICZ, T., SHAPIRO, T.A. (2006) Distinct genes encode type II Topoisomerases for the nucleus and mitochondrion in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.* 281:3048-56.
- LEBOWITZ, J.H., COBURN, C.M., MCMAHON-PRATT, D., BEVERLEY, S.M. (1990) Development of a stable *Leishmania* expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:9736-40.
- LEI, M., PODELL, E.R., CECHE, T.R. (2004) Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. *Nat Struct Mol Biol.* 11:1223-9.
- LEI, M., ZAUG, A.J., PODELL, E.R., CECHE, T.R. (2005) Switching human telomerase on and off with hPOT1 protein in vitro. *J Biol Chem.* 280:20449-56.
- LEWIS, L.K., RESNICK, M.A. (2000) Tying up loose ends: nonhomologous end-joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res.* 451:71-89.
- LIN, J.J., ZAKIAN, V.A. (1996) The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:13760-13765.
- LIRA, C.B.B., SIQUEIRA NETO, J.L., GIARDINI, M.A., WINCK, F.V., RAMOS, C.H.I., CANO, M.I.N. (2007a) LaRbp38: a *Leishmania amazonensis* protein that binds nuclear and kinetoplast DNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358:854-60.
- LIRA, C.B.B., GIARDINI, M.A., SIQUEIRA NETO, J.L., CONTE, F.F., CANO, M.I.N. (2007b) Telomere Biology of Trypanosomatids: beginning to answer some questions. *Trends Parasitol.* DOI: 10.1016/j.pt.2007.06.005.
- LIU, B., MOLINA, H., KALUME, D., PANDEY, A., GRIFFITH, J.D., ENGLUND, P.T. (2006) Role of p38 in replication of *Trypanosoma brucei* kinetoplast DNA. *Mol. Cell. Biol.* 26:5382-5393.
- LIU, D., O'COONOR, M.S., QIN, J., SONGYANG, Z. (2004) Telosome, a Mammalian Telomere-associated Complex Formed by Multiple Telomeric Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 279:51338-51342
- LOAYZA, D., DE LANGE, T. (2003) POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* 423:1013-8.

LONGHESE, M.P., PLEVANI, P., LUCCHINI, G. (1994) Replication factor A is required in vivo for DNA replication, repair, and recombination. *Mol Cell Biol.* 14:7884-90.

MAHBOUDI, F., ABOLHASSANI, M., TEHRANI, S.R., AZIMI, M., ASMAR, M. (2002) Differentiation of old and new world leishmania species at complex and species levels by PCR. *Scand J Infect Dis.* 34:756-8.

MAKAROV, V.L., HIROSE, Y., LANGMORE, J.P. (1997) Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 88:657-66.

MARCHLER-BAUER, A., BRYANT, S.H. (2004) CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* 32(Web Server issue):W327-31.

MATSUURA, A., NAITO, T., ISHIKAWA, F. (1999) Genetic control of telomere integrity in *Schizosaccharomyces pombe*: rad3(+) and tell1(+) are parts of two regulatory networks independent of the downstream protein kinases chk1(+) and cds1(+). *Genetics* 152:1501-12.

MCELLIGOTT, R., WELLINGER, R.J. (1997) The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J.* 16:3705-3714.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. (2004) Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção *Leishmania*-HIV. *Série A. Normas e Manuais Técnicos – MS* ISBN 85-334-0726-2.

MIYOSHI, T., SADAIE, M., KANO, J., ISHIKAWA, F. (2003) Telomeric DNA ends are essential for the localization of Ku at telomeres in fission yeast. *J Biol Chem.* 278:1924-31.

MORSE, R.H. (2000) RAP, RAP, open up! New wrinkles for RAP1 in yeast. *Trends Genet.* 16:51-3.

MUNOZ-JORDAN, J.L., CROSS, G.A., DE LANGE, T., GRIFFITH, J.D. (2001) T-loops at trypanosome telomeres. *EMBO J.* 20:579-588.

MURTI, K.G., PRESCOTT, D.M. (2002) Topological organization of DNA molecules in the macronucleus of hypotrichous ciliated protozoa. *Chromosome Res.* 10:165-73.

MYLER, P.J., SISK, E., MCDONAGH, P.D., MARTINEZ-CALVILLO, S., SCHNAUFER, A., SUNKIN, S.M., YAN, S., MADHUBALA, R., IVENS, A., STUART, K. (2000) Genomic organization and gene function in *Leishmania*. *Biochem Soc Trans.* 28:527-31.

NAKAMURA, T.M., MOSER, B.A., RUSSELL, P. (2002) Telomere binding of checkpoint sensor and DNA repair proteins contributes to maintenance of functional fission yeast telomeres. *Genetics* 161:1437-52.

NAVARRO, M., PENATE, X., LANDEIRA, D. (2007) Nuclear architecture underlying gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Trends Microbiol.* In press.

NEVES, D.P., MELO, A.L., GENARO, O., LINARDI, P.M. (2000). *Parasitologia Humana*. 10a Edição, Ed. Atheneu, p. 31-72.

NEVES, D.P. (2003). *Parasitologia Dinâmica*, Ed. Atheneu, p. 79-84.

NUGENT, C., HUGHES, T., LUE, N., LUNDBLAD, V. (1996) Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* 274: 249-252.

OGANESIAN, L., BRYAN, T.M.. (2007) Physiological relevance of telomeric G-quadruplex formation: a potential drug target. *Bioessays*. 29:155-65.

ONO, Y., TOMITA, K., MATSUURA, A., NAKAGAWA, T., MASUKATA, H., URITANI, M., USHIMARU, T., UENO, M. (2003) A novel allele of fission yeast rad11 that causes defects in DNA repair and telomere length regulation. *Nucleic Acids Res.* 31:7141-9

OPRESKO, P.L., VON KOBBE, C., LAINE, J.-P., HARRIGAN, J., HICKSON, I.D. & BOHR, V. (2002) Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom Syndrome helicases. *J. Biol. Chem.*, 275: 41110-41119.

PAESCHKE, K., SIMONSSON, T., POSTBERG, J., RHODES, D., LIPPS, H.J. (2005) Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures *in vivo*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12:847–854.

PANDITA, R.K., SHARMA, G.G., LASZLO, A., HOPKINS, K.M., DAVEY, S., CHAKHPARONIAN, M., GUPTA, A., WELLINGER, R.J., ZHANG, J., POWELL, S.N., ROTI ROTI, J.L., LIEBERMAN, H.B., PANDITA,

- T.K. (2006) Mammalian Rad9 plays a role in telomere stability, S- and G2-phase-specific cell survival, and homologous recombinational repair. *Mol Cell Biol.* 26:1850-64.
- PEERSEN, O.B., RUGGLES, J.A, SCHULTZ, S.C. (2002) Dimeric structure of the *Oxytricha nova* telomere end-binding protein alpha-subunit bound to ssDNA. *Nat Struct Biol.* 9:182-7.
- PENNOCK, E., BUCKLEY, K., LUNDBLAD, V. (2001) Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication. *Cell* 104:387-96.
- PISCOPO, T.V., MALLIA, A.C. (2006) Leishmaniasis. *Postgrad Med J.* 82:649-57
- PRESCOTT, D.M. (1994) The DNA of ciliated protozoa. *Microbiol Rev.* 58:233-67.
- PRICE, C.M., CECH, T.R. (1987) Telomeric DNA-protein interactions of *Oxytricha* macronuclear DNA *Genes Dev.* 1:783-793.
- PRICE, C.M., CECH, T.R. (1989) Properties of the telomeric DNA-binding protein from *Oxytricha nova*. *Biochemistry* 28:769-74.
- QI, H., ZAKIAN, V.A. (2000) The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and the telomerase-associated est1 protein. *Genes Dev.* 14:1777-1788.
- RAGHURAMAN MK, DUNN CJ, HICKE BJ, CECH TR. (1989) *Oxytricha* telomeric nucleoprotein complexes reconstituted with synthetic DNA. *Nucleic Acids Res.* 17:4235-53.
- REY, L. (2001) Parasitologia, Ed. Guanabara Koogan S.A., p.214-266.
- RIBES-ZAMORA, A., MIHALEK, I., LICHTARGE, O., BERTUCH, A.A. (2007) Distinct faces of the Ku heterodimer mediate DNA repair and telomeric functions. *Nat Struct Mol Biol.* 14:301-307.
- ROSSI, V., WINCKER, P., RAVEL, C., BLAINEAU, C., PAGES, M., BASTIEN, P. (1994) tructural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. *Mol Biochem Parasitol.* 65:271-82.

- SALAS, T.R., PETRUSEVA, I., LAVRIK, O., BOURDONCLE, A., MERGNY, J.L., FAVRE, A., SAINTOME, C. (2006) Human replication protein A unfolds telomeric G-quadruplexes, *Nucleic Acids Res.* 34:4857–4865.
- SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- SBICEGO, S., ALFONZO, J.D., ESTEVEZ, A.M., RUBIO, M.A., KANG, X., TURCK, C.W., PERIS, M., SIMPSON, L. (2003) RBP38, a Novel RNA-Binding Protein from Trypanosomatid Mitochondria, Modulates RNA Stability. *Eukaryot. Cell.* 2:560-568.
- SCHRAMKE, V., LUCIANO, P., BREVET, V., GUILLOT, S., CORDA, Y., LONGHESE, M. P., GILSON, E. & GELI, V. (2004). RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends. *Nature Genetics*, 36: 46-54.
- SEGOVIA, M. (1994) *Leishmania* gene amplification: a mechanism of drug resistance. *Ann Trop Med Parasitol.* 88:123-30.
- SERIN, M.S., WAKI, K., CHANG, K.P., ASLAN, G., DIREKEL, S., OTAG, F., KAYAR, B., KOKSAL, F., EMEKDAS, G. (2007) Consistence of minixon polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and single-copy gene sequence analyses in discriminating *Leishmania* genotypes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 57:295-9.
- SHAKIROV, E.V., SUROVTSEVA, Y.V., OSBUN, N., SHIPPEN, D.E. (2005) The *Arabidopsis* Pot1 and Pot2 proteins function in telomere length homeostasis and chromosome end protection. *Molecular and Cellular Biology* 25:7725-33.
- SHAY, J.W. (2003) Telomerase therapeutics: telomeres recognized as a DNA damage signal: *Clin Cancer Res* 9:3521-5.
- SHORE, D. (2001) Telomeric chromatin: replicating and wrapping up chromosome ends. *Curr Opin Genet Dev.* 11:189-98.
- SIMONSSON, T. (2001) G-quadruplex DNA structures--variations on a theme. *Biol Chem.* 382:621-8.

- SIMPSON, A.G., GILL, E.E., CALLAHAN, H.A., LITAKER, RW, ROGER AJ. (2004) Early evolution within kinetoplastids (euglenozoa), and the late emergence of trypanosomatids. *Protist.* 155:407-22.
- SIMPSON L. (1987) The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol.* 41, 363-82.
- SMITH, S., DE LANGE, T. (2000) Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol.* 10(20):1299-302.
- SMITH, J., ZOU, H., ROTHSTEIN, R. (2000) Characterization of genetic interactions with RFA1: the role of RPA in DNA replication and telomere maintenance. *Biochimie* 82, 71-78.
- SMOGORZEWSKA, A., VAN STEENSEL, B., BIANCHI, A., OELMANN, S., SCHAEFER, M. R., SCHNAPP, G., DE LANGE T. (2000) Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol.* 20(5):1659-68
- SMOGORZEWSKA, A. & DE LANGE, T. (2004) Regulation of Telomerase by Telomeric Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 177-208.
- SIQUEIRA NETO, J.L., LIRA, C.B.B., GIARDINI, M.A., KHATER, L., PEREZ, A.M., PERONI, L.A., DOS REIS, J.R.R., FREITAS-JUNIOR, L.H., RAMOS, C.H.I., CANO, M.I.N. (2007) *Leishmania* Replication Protein A-1 binds *in vivo* single-stranded telomeric DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358:417-23.
- STILES, J.K., HICOCK, P.I., SHAH, P.H. AND MEADE, J.C. (1999). Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parassitol.*, 93: 781-807.
- STILLMAN, B., BELL, S.P., DUTTA, A., MARAHRENS, Y. (1992) DNA replication and the cell cycle. *Ciba Found Symp.* 170:147-60.
- SUSSEL, L., SHORE, D. (1991) Separation of transcriptional activation and silencing functions of the RAP1-encoded repressor/activator protein 1: isolation of viable mutants affecting both silencing and telomere length. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:7749-7753
- TAGGART, A.K., TENG, S.C., ZAKIAN, V.A. (2002) Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science.* 297:1023-6.

- THEOBALD, D.L., WUTTKE, D.S. (2004) Prediction of multiple tandem OB-fold domains in telomere end-binding proteins Pot1 and Cdc13. *Structure* 12:1877-9
- VAN STEENSEL, B., SMOGORZEWSKA, A., DE LANGE, T. (1998) TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92:401-413.
- VANHAMME, L., PAYS, E. (1995) Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol. Rev.* 59:223-240.
- VANHAMME, L., PAYS, E., MCCULLOCH, R., BARRY, J.D. (2001) An update on antigenic variation in African trypanosomes. *Trends Parasitol.* 17:338-343.
- VELDMAN, T., ETHERIDGE, K.T., COUNTER, C.M. (2004) Loss of hPot1 function leads to telomere instability and a cut-like phenotype. *Curr Biol.* 14:2264-70.
- VOSS, T.S., MINI, T., JENOE, P., BECK, H.P. (2002) *Plasmodium falciparum* possesses a cell cycle-regulated short type replication protein A large subunit encoded by an unusual transcript. *J Biol Chem* 277:17493-501.
- WANG, F., PODELL, E.R., ZAUG, A.J., YANG, Y., BACIU, P., CECHE, T.R., LEI, M. (2007) The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* 445:506-10.
- WEI, C., PRICE, M. (2003) Protecting the terminus: t-loops and telomere end-binding proteins. *Cell Mol Life Sci.* 60:2283-94.
- WEI, C., PRICE, C.M. (2004) Cell cycle localization, dimerization, and binding domain architecture of the telomere protein cPot1. *Mol Cell Biol.* 24:2091-102.
- WHO EXPERT COMMITTEE (1990). Control of the leishmaniases. World health organization, Geneva. *Technical report Series* 793.
- WILSON, S., WARR, N., TAYLOR, D.L., WATTS, F.Z. (1999) The role of *Schizosaccharomyces pombe* Rad32, the Mre11 homologue, and other DNA damage response proteins in non-homologous end joining and telomere length maintenance. *Nucleic Acids Res.* 27:2655-61.

- WINCKER, P., RAVEL, C., BLAINEAU, C., PAGES, M., JAUFFRET, Y., DEDET, J.P., BASTIEN, P. (1996). The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nuc. Ac. Res.* 24:1688-1694.
- WIRTH, D. (1990). Molecular Biology of *Leishmania*. *Modern Parasite Biology*, ed. Wyler, D., Freeman, W. and Co. 348-361.
- WOLD, M.S. (1997) Replication Protein A: A Heterotrimeric, Single-Stranded DNA-Binding Protein Required for Eukaryotic DNA Metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 66:61-91.
- WOLD, M.S., KELLY, T. (1988) Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:2523-7.
- WOTTON, D., SHORE, D. (1997) A novel RAP1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 11:748-60.
- WRIGHT, W.E., TESMER, V.M., HUFFMAN, K.E., LEVENE, S.D., SHAY, J.W. (1997) Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev.* 1997 Nov 1;11(21):2801-9.
- XIN, H., LIU, D., WAN, M., SAFARI, A., KIM, H., SUN, W., O'CONNOR MS, SONGYANG Z. (2007) TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature* 445:559-62.
- YANG, Q., ZHENG, Y.L., HARRIS, C.C. (2005) POT1 and TRF2 cooperate to maintain Telomeric Integrity *Molecular and Cellular Biology* 25:1070-1080.
- YE, J.Z., DONIGIAN, J.R., VAN OVERBEEK, M., LOAYZA, D., LUO, Y., KRUTCHINSKY, A.N., CHAIT, B.T., AND DE LANGE, T. (2004) TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres *J. Biol. Chem.* 279: 47264–47271.
- ZAKIAN, V.A. (1995) Telomeres: begining to understand the end. *Science* 270:1601-1607
- ZAUG, A.J., PODELL, E.R., CECH, T.R. (2005) Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102:10864–10869.

ZHU, G., MARCHEWKA, M.J., KEITHLY, J.S. (1999) *Cryptosporidium parvum* possesses a short-type replication protein A large subunit that differs from its host. *FEMS Microbiol Lett* 176:367-72.

ZOU, L., LIU, D., ELLEDGE, S.J. (2003) Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:13827-32.

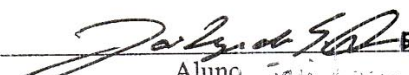
ZOU, Y., LIU, Y., WU, X., SHELL, S.M. (2006) Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses. *J Cell Physiol*. 208:267-73.

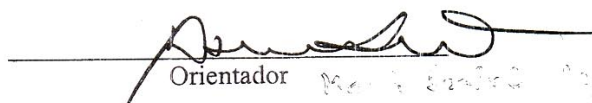
ANEXO I:

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de doutorado intitulada "**Caracterização de proteínas que se associam *in vivo* com a simples fita telomérica de *Leishmania amazonensis***":

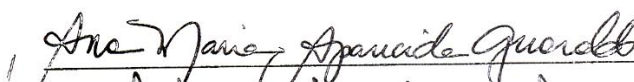
- () não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.
- (X) está inserido em projeto aprovado pela CQB (Protocolo nº 164/02), publicado dia 21/05/2002 na Universidade Estadual Paulista, Campus Rubião Júnior, Botucatu-SP.
- (X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 889-1).
- () tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).


Aluno Sandro


Orientador Profa. Dra. Maria Aparecida Guardabassi

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


Nome: Profa. Dra. Maria Aparecida Guardabassi
Função: Presidente
CEEA / IB / Unicamp
Comissão de Ética na
Experimentação Animal