

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE RNAs
TELOMÉRICOS NÃO CODANTES EM
Leishmania major

Edna Gicela Ortiz Morea

BOTUCATU-SP

2018

Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu
Seção Técnica de Pós-Graduação
Rua Professor Doutor Antonio Celso Wagner Zanin, 250, Botucatu, SP – CEP 18618-689
Telefone (14) 3880-0780 posgraduacao@ibb.unesp.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Julio de Mesquita Filho"
CAMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA FUNÇÃO DE
RNAS TELOMÉRICOS NÃO CODANTES EM
Leishmania major

Estudante: Edna Gicela Ortiz Morea

Orientador: Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano

Co-Orientador: Elton Jose Vasconcelos

Co-orientador: Claus Maria Azzalin

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

BOTUCATU-SP

-2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Morea, Edna Gicela Ortis.
Caracterização molecular da função de RNAs teloméricos não
codantes em *Leishmania major* / Edna Gicela Ortis Morea. -
Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Maria Isabel Nogueira Cano
Coorientador: Claus Maria Assalin
Coorientador: Elton Jose Rosas de Vasconcelos
Capes: 20200005

1. *Leishmania major*. 2. Leishmaniose. 3. Telômero. 4.
Acido ribonucleico. 5. Telomerase.

Palavras-chave: *Leishmania major*; TER; TERRA; leishmaniose;
telômeros.

DEDICATÓRIA

A Deus, por sempre ficar ao meu lado, por que me fortalece e me guia na realização dos meus sonhos.

Aos meus pais Luis Eduardo Ortiz Cuellar e Maria Angela Morea Toledo pelo imenso apoio e amor, pela minha formação pessoal e acadêmica.

A minha irmã Karen Johana Ortiz Morea porque sempre está comigo me apoiando e dando forças.

A toda minha família pela ajuda psicológica durante várias fases deste trabalho, e especialmente minha querida avó Mercedes Toledo quem sempre me apoiou e ajudou.

AGRADECIMENTOS

A meus pais Maria Angela Morea Toledo e Luis Eduardo Ortiz Cuellar e minha irmã Karen Johana Ortiz Morea por estarem presentes me apoiando que cada fase de desenvolvimento do doutorado

À profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano, pela competência, ensinamento e pela oportunidade de realizar o Doutorado, me orientando e guiando durante a realização deste trabalho, estou muito grata por apostar em mim.

A Adriano Calore por me acompanhar em grande parte deste processo

A todos os integrantes do laboratório de Telômero pelo apoio, companheirismo e convívios: Alejandra Viviescas, Marina Roveri, Whisnayder Gentil, Alessandro Vassilievitch, Gabriel Arantes, Vitor da Silva, Camila Storti e especialmente a Cristiane de Santis pela força no meu português

Aos meus co-orientadores Claus Azzalin e Eltom Vasconcelos por estarem sempre disponíveis para sarar minhas dúvidas e questionamento

Aos meus amigos Eder Silva e Kerly Martinez por que sei que além da distância sempre estarão torcendo por mim

Aos meus familiares e amigos

Ao programa CAPES, pela concessão da bolsa de estudos por 30 meses.

Ao programa de pós-graduação em Genética.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Julho de Mesquita Filho” UNESP.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos de Doutorado (processo FAPESP: 2016/06883-0) e bolsa BEPE (processo FAPESP: 2017/12987-5).

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima”

Louis Pasteur

“As espécies que sobrevivem não são as espécies mais fortes, nem as mais inteligentes,
e sim aquelas que se adaptam melhor às mudanças”

Charles Darwin

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

Página

<u>1. INTRODUÇÃO.....</u>	<u>1</u>
<u>1.1. O ciclo de vida dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i> spp.....</u>	<u>1</u>
<u>1.2. Leishmaniose.....</u>	<u>2</u>
<u>1.3. Transcrição e processamento de RNA em <i>Leishmania</i> spp.....</u>	<u>4</u>
<u>1.4. Telômeros.....</u>	<u>5</u>
<u>1.5. Organização telomérica e subtelomérica de <i>Leishmania</i> spp.....</u>	<u>7</u>
<u>1.6. Long noncoding RNAs com função telomérica.....</u>	<u>9</u>
<u>1.6.1. TERRA (<i>Telomeric Repeat containing RNA</i>).....</u>	<u>10</u>
<u>1.6.1.1. Regulação da expressão do TERRA.....</u>	<u>11</u>
<u>1.6.2. RNA telomerase (TER).....</u>	<u>13</u>
<u>CAPÍTULO 1.....</u>	<u>16</u>
<u>2. CARACTERIZAÇÃO DO LONGO RNA TELOMÉRICO NÃO</u>	
<u>CODIFICADOR TERRA EM <i>Leishmania major</i>.....</u>	<u>16</u>
<u>2.1. INTRODUÇÃO.....</u>	<u>16</u>
<u>2.2. OBJETIVOS.....</u>	<u>19</u>
<u>2.2.1. Objetivo geral.....</u>	<u>19</u>
<u>2.2.2. Objetivos específicos.....</u>	<u>19</u>
<u>2.3. MATERIAL E MÉTODOS</u>	<u>20</u>
<u>2.3.1. Material biológico e condições de crescimento de <i>Leishmania major</i>.....</u>	<u>20</u>
<u>2.3.2. Caracterização do TERRA em <i>Leishmania major</i>.....</u>	<u>20</u>
<u>2.3.3. Análise <i>in silico</i> da presença do TERRA e/ou seus similares e ilhas CpGs</u>	
<u>putativas em <i>Leishmania major</i>.....</u>	<u>21</u>
<u>2.3.4. Northern blot.....</u>	<u>22</u>
<u>2.3.5. RNA-FISH.....</u>	<u>23</u>
<u>2.3.7. Análise da expressão do TERRA.....</u>	<u>23</u>

2.3.8. PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) para validação de alterações na expressão das extremidades cromossômicas.....	24
2.3.6. Southern blot.....	25
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
2.4.1. Identificação e caracterização molecular de lncRNA do tipo TERRA em <i>L. major</i> baseados nos dados das bibliotecas SL-Seq.....	26
2.4.2. Classificação dos transcritos TERRA em <i>L. major</i> baseados nos dados das bibliotecas SL-Seq e ensaios de validação dos dados.....	39
2.4.3. Análise cromossomo-específico da transcrição do TERRA nas três formas de desenvolvimento de <i>L. major</i>	47
2.5. CONCLUSÃO.....	55
CAPÍTULO 2.....	56
3. CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO DA ILHA CPG PUTATIVA LOCALIZADA NA REGIÃO SUBTELOMÉRICA DO CROMOSSOMO 10 EM <i>L. major</i>	56
3.1. INTRODUÇÃO.....	56
3.2. OBJETIVOS.....	58
3.2.1. Objetivo geral.....	58
3.2.2. Objetivos específicos.....	58
3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3.3.1. Clonagem e sequenciamento do transcrito de TERRA e ilha CpG putativa da extremidade do braço direito do cromossomo 10.....	59
3.3.2. Análise de detecção de metilação nas ilhas CpGs putativas localizadas em região subtelomérica.....	59
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.5. CONCLUSÃO.....	66
CAPÍTULO 3.....	67
4. CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO DO TER EM <i>L. major</i>	67
4.1. INTRODUÇÃO.....	67
4.2. OBJETIVOS.....	69
4.2.1. Objetivo geral.....	69
4.2.2. Objetivos específicos.....	69
4.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	70

4.3.1. Material biológico e condições de crescimento de <i>Leishmania major</i>	70
4.3.2. Transformação genética de <i>Leishmania major</i>	70
4.3.3. Análises <i>in silico</i> do TER em bibliotecas de SL-Seq.....	70
4.3.4. Construção do cassete de expressão contendo o TER de <i>L. major</i>	70
4.3.5. Construção do plasmídeo para edição gênica do RNA TER via CRISPR-Cas9.....	71
4.3.6. Padronização e utilização dos oligonucleotídeos antisense do tipo <i>morpholinos</i> para <i>knockdown</i> do TER.....	72
4.4. RESULTADOS E DISCUSÃO.....	75
4.4.1. Caracterização da função do TER.....	75
4.4.2. Inibição da maturação do transcrito TER (<i>knockdown</i>).....	77
4.5. CONCLUSÃO.....	80
5. REFERENCIAS.....	81
6. ANEXOS.....	89
Anexo 1. Resultados normalizados em RPKM das extremidades dos 36 cromossomos de <i>L. major</i> obtidos das análises nas bibliotecas SL-Seq.....	89
Anexo 2. Resultados do diagrama de Venn.....	91
Anexo 3. Sequência de nucleotídeos de uma parte do transcrito TERRA de <i>L. major</i> originado do braço direito do cromossomo 10.....	92
Anexo 4. Sequência de nucleotídeos da ilha CpG putativa presente em posição subtelomérica no braço direito do cromossomo 10.....	92
Anexo 5. Sequência de nucleotídeos do componente TER de <i>L. major</i> (LeishTER).....	93
8. APÊNDICE E MATERIAL SUPLEMENTAR.....	94
Tabela suplementar 1. Iniciadores e sondas utilizados neste trabalho.....	94
Apêndice 1. Artigo publicado em: BBA General Subjects como autor principal.....	95
Apêndice 2. Capítulo de livro publicado como colaboradora.....	96
Apêndice 3. Relatório de estágio no exterior com bolsa BEPE da FAPESP.....	97

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1.1. Esquema do ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	2
Figure 1.2. Transcrição policistrônica e maturação do mRNA em trypanosomatídeos.....	5
Figura 1.3. Elongação dos telômeros pelo complexo telomerase.....	7
Figure 1.4. Modelo da organização das extremidades cromossômicas em <i>L. major</i>	8
Figura 1.5. Transcriptoma telomérico.....	9
Figure 1.6. Predição da estrutura secundária de TER em <i>L. major</i>	15
Figure 2.1. Resumo da metodologia SL-Seq para análise de transcritos maduros nas três formas de desenvolvimento de <i>L. major</i>	21
Figura 2.1. Número de sinais SL em cada uma das extremidades cromossômicas nas três formas de desenvolvimento de <i>L. major</i>	29
Figura 2.2. Esquema de uma extremidade cromossômica com presença de mais de um sinal de SL.....	32
Figura 2.3. Tamanho dos transcritos TERRA em cada uma das extremidades com sinal SL, nas três formas de desenvolvimento do parasito.....	33
Figura 2.4. Diagrama de Venn mostrando a expressão comum e diferenciada dos transcritos nas extremidades cromossômicas dos 36 cromossomos de <i>L. major</i>	37
Figura 2.5. Transcritos (RPKM) de cada uma das extremidades do braço esquerdo (A) e braço direito (B), nas três formas de desenvolvimento da <i>Leishmania</i>	39
Figura 2.6. Análise <i>in silico</i> das extremidades dos 36 cromossomos de <i>L. major</i> na forma amastigota, promastigota e metacíclica baseados na presença (+) e ausência (-) de CSB (vermelho), SL (sequência líder) (verde) e ilhas CpG putativas (azul).....	42
Figura 2.7. Transcritos TERRA detectados via Northern blot utilizando RNA total das formas amastigota, promastigota e metacíclica de <i>L. major</i>	43
Figura 2.8. Transcritos TERRA são detectados em formas promastigota de <i>L. major</i> após várias duplicações celulares.....	45
Figure 2.9. Localização subcelular do TERRA em formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> usando RNA-FISH.....	47
Figure 2.10. Detecção de transcritos da fita telomérica rica em G durante o ciclo de desenvolvimento de <i>L. major</i>	49

Figure 2.11. A maioria dos transcritos TERRA são poliadenilados nas três formas de desenvolvimento <i>L. major</i>	51
Figura 2.12. Perfil de restrição telomérica nas diferentes formas de desenvolvimento de <i>L. major</i> e em parasitas que acumularam várias duplicações celulares.....	54
Figura 3.1. Comparação entre as regiões subtelo méricas de cromossomos humanos e do cromossomo 10 de <i>L. major</i>	61
Figura 3.2. Blast do sequenciamento do TERRA transcrito a partir do braço direito do cromossomo 10.....	62
Figura 3.3. Clonagem da ilha CpG putativa presente na região subtelo mérica do braço direito do cromossomo 10.....	63
Figure 3.4. Detecção de sítios de metilação nas ilhas CpGs putativas encontradas na região subtelo mérica do braço direito do cromossomo 10.....	64
Figura 3.5. Sequenciamento de DNA da ilha CpG #61 putativa do cromossomo 10 da <i>L. major</i> das três formas de desenvolvimento (promastigota, metacíclica e amastigota) tratado com bissulfato de sódio para detecção da presença de m ⁵ C.....	65
Figura 4.1. Mapa do pLS7-LmTERT.....	72
Figura 4.2. Esquema de inibição da maturação do transcrito TER utilizando oligo <i>morpholinos</i>	74
Figura 4.3. Número de transcritos (RPKM) correspondentes aos componentes TER e TERT da telomerase de <i>L. major</i>	76
Figura 4.4. Clonagem do TER.....	77
Figura 4.5. Localização celular do <i>morpholino</i> controle em formas promastigotas de <i>L. major</i>	78
Figura 4.6. Localização celular do <i>morpholino</i> LmTER em formas promastigotas de <i>L. major</i>	79

LISTA DE TABELAS

Página

<u>Tabela 2.1.</u> Presença de CSB nas extremidades cromossômicas no genoma de <i>L. major</i>	27
<u>Tabela 2.2.</u> Presença de ilhas CpG putativas nas extremidades cromossômicas no genoma de <i>L. major</i>	27
<u>Tabela 2.3.</u> Presença de sinal SL nas extremidades cromossômicas das três formas de desenvolvimento de <i>L. major</i>	28
<u>Tabela 2.4.</u> Análise <i>in silico</i> das extremidades dos 36 cromossomos de <i>L. major</i> na forma amastigota, baseados na presença (+) e ausência (-) de CSB, SL e CpG.....	40
<u>Tabela 2.5.</u> Análise <i>in silico</i> das extremidades dos 36 cromossomos de <i>L. major</i> na forma promastigota, baseados na presença (+) e ausência (-) de CSB, SL e CpG.....	41
<u>Tabela 2.6.</u> Análise <i>in silico</i> das extremidades 36 cromossomos de <i>L. major</i> na forma metacíclica, baseados na presença (+) e ausência (-) de CSB, SL e CpG.....	41
<u>Tabela 2.7.</u> Características estruturais presentes nas extremidades dos 36 cromossomos de <i>L. major</i> braço esquerdo e direito). Presença (+) ou ausência (-) de SL, CSB ou putativas ilhas CpG.....	48

Resumo

Os protozoários do gênero *Leishmania* causam leishmaniose, uma doença tropical negligenciada, que se apresenta de diferentes formas clínicas e que acomete milhões de pessoas no Brasil e no mundo. Até o momento não existe nenhuma vacina ou tratamento eficientes para leishmaniose e por isso, estudos que contribuam para o entendimento da biologia e fisiologia do parasito podem fornecer uma possibilidade de encontrar novos alvos terapêuticos. Este é o caso dos telômeros, cuja função principal é manter a estabilidade do genoma que se perturbada pode afetar diretamente a proliferação ou multiplicação dos parasitos. Os telômeros são estruturas nucleoprotéicas localizadas nas extremidades dos cromossomos, mantidos pela enzima telomerase. Eles são regulados por diversos processos entre os quais se encontram alguns longos RNAs não codificadores (lncRNA). Entre os lncRNAs com função telomérica está o TER (RNA Telomerase) o qual é um dos principais componentes do complexo telomerase, pois contém uma pequena sequência molde a qual é copiada pela telomerase durante a replicação dos telômeros, o TER foi recentemente identificado em *Leishmania* spp., porém se desconhece a sua função e biogênese. Outro RNA não codificante com função telomérica é o TERRA (Repetições Teloméricas contendo RNA), os quais são essenciais para a manutenção dos telômeros.

Até o momento, identificamos a presença do TERRA expressos a partir das extremidades cromossômicas nas diferentes fases de desenvolvimento (amastigota, promastigota e metacíclica) do parasito. Para isso, utilizamos bibliotecas SL-Seq independentes construídas a partir de RNA total das três formas do parasito, em busca de transcritos que apresentassem o sinal da sequência líder (SL) posicionada a montante das repetições subteloméricas, como um marco que determina o processo de maturação do RNA mensageiro. Além do sinal SL, foi identificada a existência de elementos subteloméricos conservados em *Leishmania*, denominados CSB (Conserved Sequence Boxes), e ilhas CpGs putativas. Usando esta abordagem nós encontramos 7 classes diferentes de extremidades cromossômicas em *L. major*. Os resultados obtidos *in silico* foram validados experimentalmente utilizando Northern blot e RT-PCR. Foi confirmada a existência de transcritos TERRA com tamanho e número variável e expressão diferenciada entre as diferentes formas de desenvolvimento. No entanto, esses transcritos foram identificados em alguns cromossomos e não em todos, confirmando os resultados obtidos *in silico*. Transcritos TERRA maduros poliadenilados originados de alguns

cromossomos também foram identificados nas três formas do parasito. Além disso, foi analisado o comprimento dos telômeros em um ciclo de desenvolvimento e nas fases promastigotas e metacíclicas mantidas *in vitro* até 6 repiques sucessivos (passagem 1-6). Os resultados mostraram que durante um ciclo de desenvolvimento as formas amastigotas apresentam telômero mais curtos que as formas promastigota e metacíclica derivadas da mesma, e que o tamanho dos telômeros diminui progressivamente nas formas promastigotas e metacíclicas delas derivadas, durante repiques sucessivos *in vitro*. Também observamos que nos parasitos que apresentam encurtamento progressivo dos telômeros se detecta aumento dos níveis de transcritos TERRA. Portanto, esses resultados sugerem que i) há regulação da expressão de TERRA em nível transcricional nos telômero durante o desenvolvimento de *L. major*, ii) o TERRA pode estar diretamente envolvido com a manutenção dos telômeros nesses parasitas, talvez regulando negativamente a atividade da telomerase e que iii) provavelmente as formas promastigotas e metacíclicas delas derivadas entram em senescência replicativa após vários ciclos de duplicação *in vitro*.

Em relação à identificação das ilhas CpGs putativas em posição subtelomérica, foram realizadas inicialmente análise de metilação de DNA baseado na utilização de enzimas de restrição bloqueadas por metilação. Os resultados sugerem que estas regiões podem estar metiladas, porém ensaios de tratamento de bissulfito seguido de sequenciamento não confirmaram estes achados.

Em relação ao componente RNA da telomerase, TER, para ajudar no entendimento da sua função na biologia do parasito, o gene foi inicialmente clonado e sequenciado para posteriormente ser subclonado em vetor de expressão em *Leishmania* spp. para realizar as análises funcionais. Um vetor utilizando a metodologia CRISPR/Cas9 para edição do TER no genoma de *L. major* foi desenhado e está em fase de construção. Também foi padronizada a utilização de oligonucleotídeos antisenso do tipo morpholinos, como ferramenta capaz de abolir a maturação do mRNA TER. Esta metodologia é uma ferramenta muito importante para a realização de knockdown em *Leishmania* spp., pois somente poucas espécies destes parasitos possuem maquinaria de RNA de interferência.

Palavras chave: *Leishmania major*, Leishmaniose, Telômero, Ácido ribonucleico, Telomerase.

Abstract

Protozoan from *Leishmania* genus are the etiologic agents of leishmaniasis, a tropical disease that presents different clinical manifestations and affect million people in Brazil and in the world. There are no eficiente vacines nor treatment protocols against leishmaniasis, therefore, it is crucial to improve the knowledge about *Leishmania* molecular biology and physiology for the development of new therapies. Actually, telomeres have been considered potential molecular targets as they are responsible to maintain genome stability. *Leishmania* telomeres similarly to other eukaryotes, are nucleoprotein structures found at the end of the chromosomes maintained by telomerase. They can be regulated by different mechanisms such as the action of long non-coding telomeric RNAs (lncRNAs). Among the telomeric lncRNAs are the telomerase RNA component (TER) which is crucial for telomerase activity because it contains the template sequence that is copied by telomerase during telomere elongation. TER was recently identified in *Leishmania* although there is no information about its function and biogenesis. TERRA, the Telomere Repeat containing RNA is other telomeric RNA that it is involved with telomere length regulation telomere damage response and alterations in the composition of telomeric chromatin and is essential for telomere maintenance.

In this work, we identified TERRA transcripts in the three *Leishmania* developmental stages (amastigote, promastigote e metacyclic). We interrogate three independent SL-Seq libraries obtained from total RNA obtained from *Leishmania* developmental stages and search for transcripts that present the sequence leader (SL) signal located upstream the subtelomeric/telomeric repeats as a mark for mRNA maturation. In addition, we had also search the *L. major* genome for the presence of *Leishmania* specific subtelomeric elements, the Conserved Sequence Boxes (CSB) and putative subtelomeric CpG islands. Using this approach, we found 7 different types of chromosome ends in *L. major*. *In silico* results were validated using Northern blot and RT-PCR/RT-qPCR. We confirmed the existence of TERRA transcripts of variable length and size, which also present different expression profiles depending on the parasite life stage. Our analyses also revealed the existence of polyadenilated TERRA transcripts from some but not all chromosome ends.

In addition, telomere length analysis was done using parasites originated from a single developmental cycle and from promastigote and metacyclic forms maintained *in vitro* for up to 6 successive replicas in culture. The results showed that during a single

developmental cycle amastigote forms present shorter telomeres than promastigotes and metacyclic derived there from. In addition telomeres length progressively shorten in promastigote and derived metacyclic during successive *in vitro* cultivation, or after increasing population doubling. We also observed that parasites showing progressive telomeres shortening have increased levels of TERRA transcripts.

Therefore, these results suggest that i) TERRA expression is probably regulated at the transcriptional level during *L. major* development, ii) TERRA may be directly involved in parasite telomere maintenance, probably acting as a negative regulator of telomerase activity, and iii) probably promastigotes and derived metacyclic forms enter into replicative senescence after several population derived therefrom enter into replicative senescence after several population doubling cycles *in vitro*.

To identified putatives CpG islands at subtelomeric position, we first performed digestion of DNA with methylation sensitive restriction enzymes. Although these results suggested the existence of methylated DNA at the subtelomeric putative CpG islands, bisulfite treatment followed by DNA sequencing did not confirm these findings.

We had also initiate functional studies about a *L. major* TER component. We cloned, sequenced and subcloned TER gene (leishTER) in a *Leishmania* expression vector. In addition, we also design a CRISPR/Cas9 system to genetic edit the *L. major* TER in the parasite genome. And finally, we have standardized the use of antisense morpholine oligonucleotides as a tool to inhibit the maturation of the *Leishmania* TER component. This later approache will be valuable to study the functions of genes encoding protein and lncRNA in these protozoa, since only a few *Leishmania* species present the RNA interference machinery.

Key words: *Leishmania major*, Leishmaniosis, Telomere, Ribonucleic acid, Telomerase

1. INTRODUÇÃO

1.1. O ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania* spp.

O gênero *Leishmania* pertence à ordem Kinetoplastida, que se distingue dos demais eucariotos principalmente pela presença do cinetoplasto, uma estrutura em forma de disco, rica em DNA, localizada na única mitocôndria que está associada à base dos flagelos. As *Leishmania* spp. pertencem à família Trypanosomatidae, e este gênero compreende parasitos dimórficos, os quais apresentam três estágios morfológicos de desenvolvimento durante seu ciclo de vida ou ciclo biológico, considerado heteroxênico. A forma amastigota é a forma intracelular, encontrada no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do mamífero (hiraces, roedores, canídeos e humanos), considerado hospedeiro vertebrado ou definitivo. Estas formas se apresentam no formato esférico, possuem um núcleo localizado em uma das extremidades, um cinetoplasto e um flagelo inaparente. Durante o repasto sanguíneo, insetos do gênero *Phlebotomus* (Velho mundo) e *Lutzomyia* (Novo mundo) (hospedeiro intermediário) ingerem formas amastigotas as quais, após 12 a 18 horas se transformam em promastigotas no sistema digestivo do inseto. Promastigotas são formas curtas, ovóides e apenas ligeiramente móveis, que nas seguintes 30 a 60 horas, se multiplicam rapidamente e em seguida se transformam em uma forma longa, mais fina e ativamente movel denominada nectomonadas. Estes, nas próximas 60-72 horas são encontrados na porção do intestino médio do inseto. Após 7-10 dias nectomonadas migram à válvula faríngea do inseto, onde ocorre a metaciclo-gênese, que se refere à diferenciação dos promastigotas em metacíclicos. As formas metacíclicas, são curtas, delgadas, altamente móveis com um flagelo pelo menos com o dobro do tamanho da célula e não apresentam divisão. Acredita-se que apenas esta forma seja levada à pele quando o flebotomíneo infectado faz o repasto sanguíneo. As diferentes formas da fase promastigota possuem um flagelo na região anterior, são alongadas (aspecto fusiforme ou piriforme) com o núcleo geralmente na região central e o cinetoplasto é localizado na região anterior (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003; KILLICK-KENDRICK; MOLYNEUX; ASHFORD, 1974; NEVES et al., 2000; REY, 2001; SACKS; KAMHAWI, 2001; SACKS; PERKINS, 1984) (Fig. 1.1).

Além das modificações morfológicas ocorridas durante seu ciclo de vida, nos hospedeiros invertebrado e vertebrado, todas as espécies de *Leishmania* spp. também apresentam diferenças no metabolismo e na expressão gênica (BARRETT et al., 2003;

DILLON et al., 2015; GULL, 2001; INBAR et al., 2017; JOHNSTON et al., 1999; SIMPSON et al., 2004).

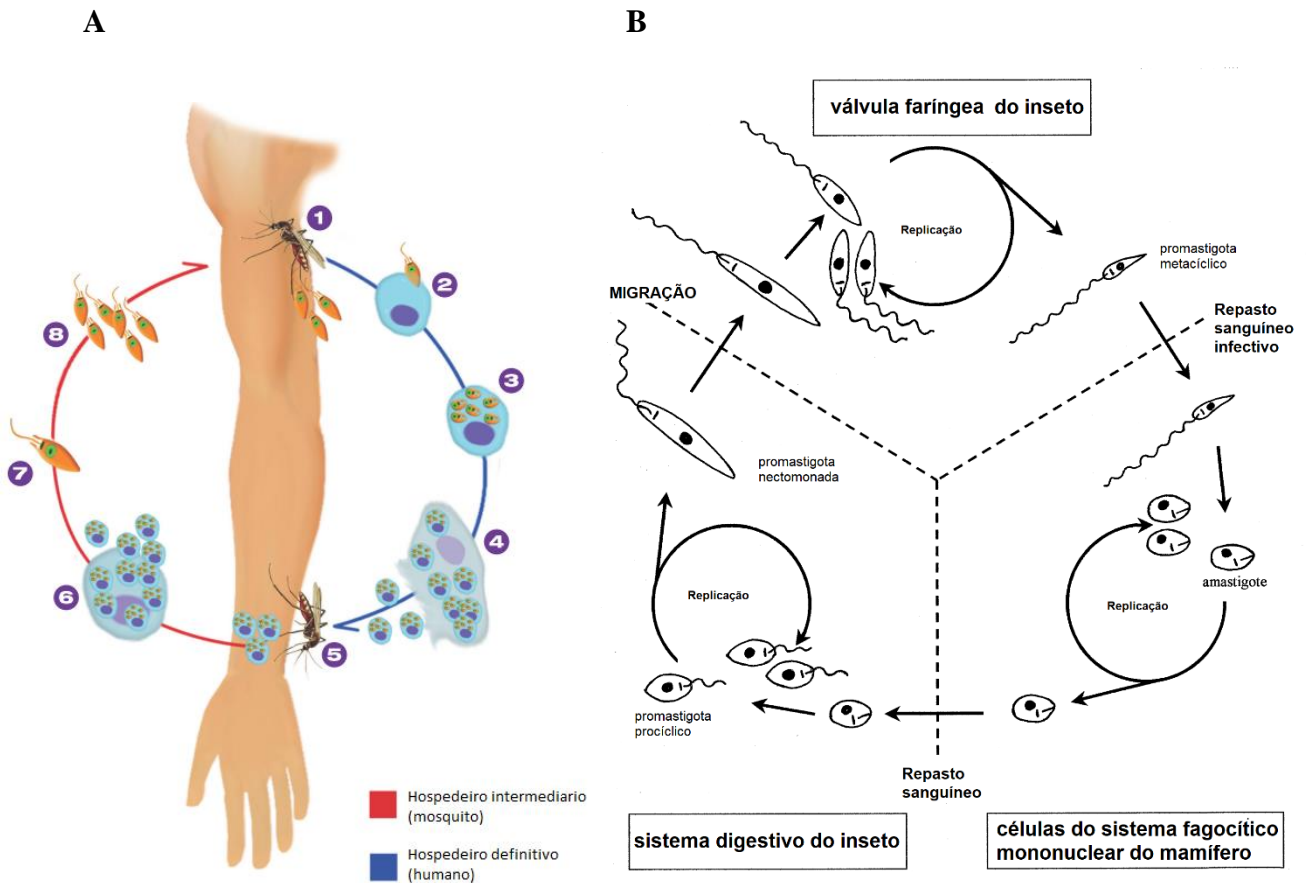


Figura 1.1. Esquema do ciclo de vida de *Leishmania* spp. **A)** 1. O inseto injeta promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo; 2. promastigotas metacíclicas infectam macrófagos e outros tipos de células fagocíticas mononucleares; 3. Promastigotas se transformam em amastigotas dentro de macrófagos; 4. Multiplicação das amastigotas dentro de macrófagos. 5. e 6. Inseto ingere amastigotas de macrófagos infectados durante o repasto sanguíneo; 7. No tubo digestivo do inseto amastigotas se transformam em promastigotas; 8. Promastigotas se dividem e migram para a probóscide do inseto onde se transformam em promastigotas metacíclicas. (Figura extraída de (PREVENTION, [s.d.]; VERMELHO et al., 2017). **B)** Ciclo no inseto vetor (figura retirada de (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003)).

1.2. Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença transmitida por insetos flebotomíneos e é causada por espécies do gênero *Leishmania*. A infecção humana é causada por cerca de 20 espécies de parasitos, que estão espalhados por cerca de 30 espécies de flebotomíneos (mosquitos) que infectam mamíferos. As diferentes espécies são morfologicamente indistinguíveis, mas podem ser diferenciadas por análise de isoenzimas, métodos moleculares, ou anticorpos monoclonais (PREVENTION, [s.d.]).

A leishmaniose é encontrada em áreas focais de mais de 90 países nos trópicos, subtropicais (GULL, 2001; JOHNSTON et al., 1999) e sul da Europa (ANTINORI; SCHIFANELLA; CORBELLINO, 2012; PREVENTION, [s.d.]). A leishmaniose geralmente é mais comum em áreas rurais do que urbanas, podendo ser encontrada na periferia de algumas cidades. Mudanças ambientais como o desmatamento, irrigação e urbanização têm o potencial para expandir a abrangência geográfica dos vetores flebotomíneos e as áreas do mundo onde a leishmaniose é encontrada (“WHO | Leishmaniasis”, 2017). A leishmaniose forma um grande espectro de doenças, classificadas em quatro grupos segundo as características clínicas e epidemiológicas: A forma cutânea é a mais comum, provoca úlceras nas zonas expostas do corpo e deixa cicatrizes permanentes e dependendo da espécie podem ser auto curadas ou levar a incapacidades graves quando o hospedeiro é limitado imunologicamente podendo desenvolver a forma cutânea difusa. A mucocutânea: conduz à destruição parcial ou completa das membranas mucosas do nariz, boca e garganta e a visceral pode ser letal se não tratada a tempo, sendo caracterizada por episódios de febre, perda de peso e anemia. As formas clínicas são determinadas pela espécie, fatores do hospedeiro e resposta imuno-inflamatórias podendo variar de subclínica a infecção disseminada com diferentes apresentações e resultados (BESTEIRO et al., 2006; MURRAY et al., 2005).

Até o momento não existe nenhuma vacina ou tratamento eficiente e/ou acessível para as diferentes formas de leishmaniose. Os antimoniais pentavalentes são os fármacos de escolha preconizados pela OMS para o tratamento das leishmanioses, entretanto apresentam problemas de toxicidades e resistência pelos parasitos (BERMAN, 2005; CHAPPUIS et al., 2007; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; “WHO | Leishmaniasis”, 2017) e a miltefosina por sua vez não pode ser utilizada em toda a população, pois apresenta efeitos teratogênicos (CHAPPUIS et al., 2007). A anfotericina B tem alta eficácia e poucos efeitos secundários, porém, não é utilizado em países em desenvolvimento por seu alto custo (CHAPPUIS et al., 2007; “WHO | Leishmaniasis”, 2017). Um dos maiores problemas para tratar a leishmaniose, é em parte, dado à resposta negativa dos pacientes aos diferentes fármacos, somado a este, a maioria dos pacientes não finalizam o tratamento adequadamente (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Atualmente diversas pesquisas estão sendo realizadas na busca de tratamentos e estratégias eficientes contra a leishmaniose, devido à necessidade de se encontrar fármacos ou metodologias que proporcionem segurança para os pacientes e que possam combater ou prevenir esta doença.

Estudos que contribuem com o entendimento da biologia e fisiologia das *Leishmania* spp. e a identificação de novas sequências funcionais no genoma e transcriptoma fornecem uma possibilidade de encontrar novos alvos terapêuticos. Um dos possíveis alvos terapêuticos são os telômeros, já que, uma de suas principais funções é a de estabilizar o genoma, podendo afetar diretamente a proliferação ou multiplicação da *Leishmania* (SEKARAN; SOARES; JARSTFER, 2014).

1.3. Transcrição e processamento de RNA em *Leishmania* spp.

Parasitas do gênero *Leishmania* exibem uma biologia molecular incomum possuindo características biológicas peculiares e particulares como: arquitetura do DNA mitocondrial, conhecida como cinetoplasto (característica de todas as espécies pertencentes à ordem Kinetoplastida), edição de RNAs, compartimentalização de glicose, organização característica das sequências subteloméricas e teloméricas. O genoma destes parasitos é organizado em grandes clusters gênicos bidirecionais, sem a presença de íntrons, que compreendem alguns milhares de genes que não se sobrepõem nas duas fitas de DNA (REIS-CUNHA et al., 2016). Ou seja, os genes se apresentam em fitas diferentes e em orientação oposta, separados por regiões denominadas *strand-switch* (Fig. 1.2). Os clusters gênicos transcritos por RNA polimerase II, são transcritos policistronicamente, e a partir destes policistrons os pré-mRNA são processados rapidamente no núcleo para gerar transcritos maduros monocistrônicos por *trans*-splicing e adição de cauda poliadenilada (DA SILVA et al., [s.d.]; FU; BARKER, 1998; REIS-CUNHA et al., 2016; TEIXEIRA; VALENTE, 2016).

A reação de transesterificação denominada *trans*-splicing é realizada pela adição de um minixon de 39 nucleotídeos, específicos para cada espécie de *Leishmania*, conhecido também como sequência líder (SL). Os SL são adicionados na extremidade 5' de cada transcrito durante a maturação do mRNA; junto a sequência SL é adicionado o *cap* de tri-metil guanosina (TMG) na região 5' de cada transcrito (AGAMI; SHAPIRA, 1992; BORST, 1986; LANDFEAR; WIRTH, 1985; MILLER; LANDFEAR; WIRTH, 1986). Finalmente para obter os transcritos maduros é adicionada uma cauda de poli adenina no terminal 3' de cada transcrito. Esta adição é governada pela localização do sítio acceptor de *splicing* do gene localizado a jusante no policistron (LEBOWITZ et al., 1993). É importante ressaltar que os genes provenientes do mesmo transcrito policistrônico não são relacionados funcionalmente e nem possuem iguais níveis de expressão (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007), sendo o processo de maturação um

importante mecanismo de regulação gênica em nível pós-transcricional. O processo de adição do *cap* junto a sequência SL na extremidade 5' e a poliadenilação na extremidade 3', são essenciais para a maturação de mRNA que codificam proteínas, como também para os transcritos que não codificam proteínas, por exemplo lncRNAs (DILLON et al., 2015).

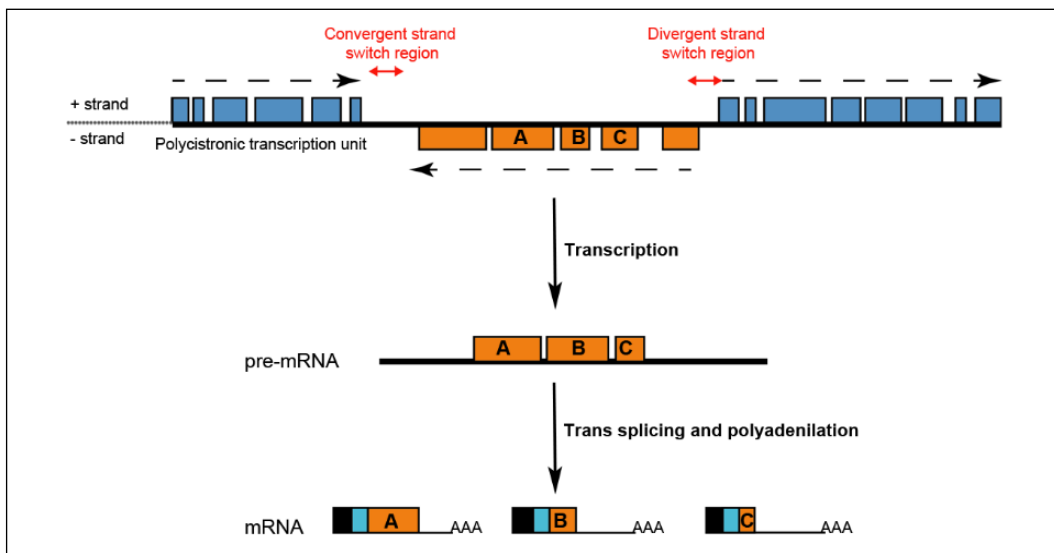


Figura 1.2. Transcrição policistrônica e maturação do mRNA em trypanosomatídeos. Organização dos genes em grandes clusters bidirecionais que são separados por regiões *strand-switch*. RNAs policistrônicos são processados para gerar RNA monocistrônicos por *trans*-splicing e poliadenilação. Os RNAs maduros apresentam sequência SL (caixa preta) na extremidade 5', região 5'UTR (caixa azul claro) seguido das sequências codificadora (caixas laranjas) da região 3'UTR (linha preta) e da cauda de poliadenina. Figura retirada de (REIS-CUNHA et al., 2016).

1.4. Telômeros

Os telômeros são estruturas nucleoprotéicas formadas por interações entre proteínas e por sequências de DNA repetitivas não codificadoras, localizados nas extremidades dos cromossomos (BLACKBURN; GALL, 1978; PRYDE; GORHAM; LOUIS, 1997). O DNA telomérico é formado por uma fita dupla (uma rica em G e a outra rica em C) e uma fita simples (rica em G) localizada na extremidade 3' conhecida também como 3' G-overhang (BLACKBURN, 2005; CHAN; BLACKBURN, 2004; HENDERSON; BLACKBURN, 1989; WRIGHT et al., 1997). A região da fita dupla dos telômeros em humanos está associada a um complexo nucleoprotéico conhecido como *Shelterin*, que impede que os telômeros sejam reconhecidos e processados como quebras de DNA em dupla fita (DE LANGE, 2005). Os telômeros estão presentes principalmente em células eucariotas e são responsáveis por proteger os cromossomos da degradação,

recombinação e translocação, assegurando que a informação genética seja corretamente copiada durante a duplicação celular. Os telômeros também ajudam a regular o comprimento do DNA telomérico e são essenciais para a finalização da duplicação do DNA durante o ciclo celular, estando associados a diversos processos importantes tais como: controle da divisão celular, envelhecimento, regulação da transcrição, integridade do genoma e manutenção da arquitetura nuclear (CHAN; BLACKBURN, 2004; DMITRIEV; PETROV; DONTSOVA, 2003; GIARDINI et al., 2014).

Na maioria dos organismos investigados, a síntese dos telômeros ou repetições teloméricas é realizada pela telomerase, à exceção das *Drosophilas*, nas quais os telômeros são retrotransposons sintetizados por transcriptase reversa (PARDUE et al., 1996; ZAKIAN, 1995). A telomerase é responsável pela adição de DNA nas extremidades dos cromossomos, utilizando os próprios telômeros como substrato (BLACKBURN, 1990; GREIDER, 1996).

A telomerase é uma ribonucleoproteína (RNP) com função de transcriptase reversa especializada, composta por dois componentes principais: a proteína telomerase transcriptase reversa (ex: TERT em vertebrados e Est2 em leveduras de brotamento) e o RNA não codificador (ex: RNA telomerase TER em vertebrados e Tlc1 em leveduras de brotamento), além de diversos fatores acessórios (HUG; LINGNER, 2006; SMOGORZEWSKA; DE LANGE, 2004). Os componentes TERT e TER são essenciais para propiciar a manutenção do telômero *in vivo* (CHIANG et al., 2004).

A expressão de alguns componentes da holoenzima da telomerase são estritamente regulados e organismo-dependente (AUTEXIER; LUE, 2006). Em eucariotos unicelulares, TERT e TER estão constitutivamente expressos, enquanto que em mamíferos, TERT está expressa somente em células altamente proliferativas e em células tumorais. Além disso, a atividade de telomerase é ausente em células somáticas e em células com pouca capacidade proliferativa. A telomerase promove a homeostase do comprimento do telômero pela adição de repetições teloméricas nas extremidades 3' dos cromossomos, utilizando como molde uma sequência contida no RNA TER (GREIDER, 1996; KIM et al., 1994) (Fig. 1.3).

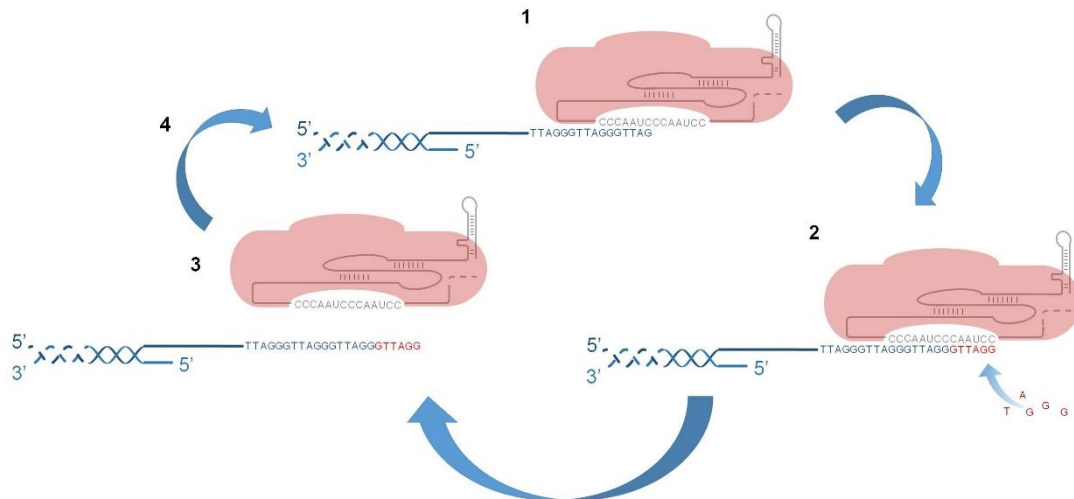


Figura 1.3. Elongação dos telômeros pelo complexo telomerase. Primeiro o complexo telomerase interage com os telômeros a partir da associação do molde, contendo a repetição telomérica no TER, ao terminal simples fita 3' G-overhang (1). Em seguida a TERT adiciona nucleotídeos na extremidade 3' do DNA telomérico até que se complete uma repetição telomérica utilizando o molde contido no TER (2). Este processo é conhecido como adição progressiva de nucleotídeos (NAP). Então, o sítio ativo TERT se dissocia (3) e se transloca para reposicionar a extremidade 3' do molde na repetição telomérica recém formada, reiniciando novo ciclo de elongação dos telômeros (4). Figura extraída de (GIARDINI et al., 2014).

1.5. Organização telomérica e subteloemérica de *Leishmania* spp.

Espécies de *Leishmania* varia de 33-36 cromossomos, e suas regiões subteloeméricas TAS (*Telomere-Associated Sequence*) consistem principalmente de repetições de 100pb conhecidas como LCTAS (*Leishmania Conserved Telomere-Associated Sequence*) as quais se intercalam com repetições CCCTAAA (CHIURILLO et al., 1999; CONTE; CANO, 2005; FU; BARKER, 1998; FU; PERONA-WRIGHT; BARKER, 1998). A comparação das LCTAS entre diferentes espécies de *Leishmania* mostrou a presença de duas sequências conservadas CSB (*Conserved Sequence Boxes*): CSB1 (GTACAGT) e CSB2 (GGAGAGGGTGT), separadas entre si por 1 a 51 pares de bases (FU; BARKER, 1998) (Fig. 1.4).

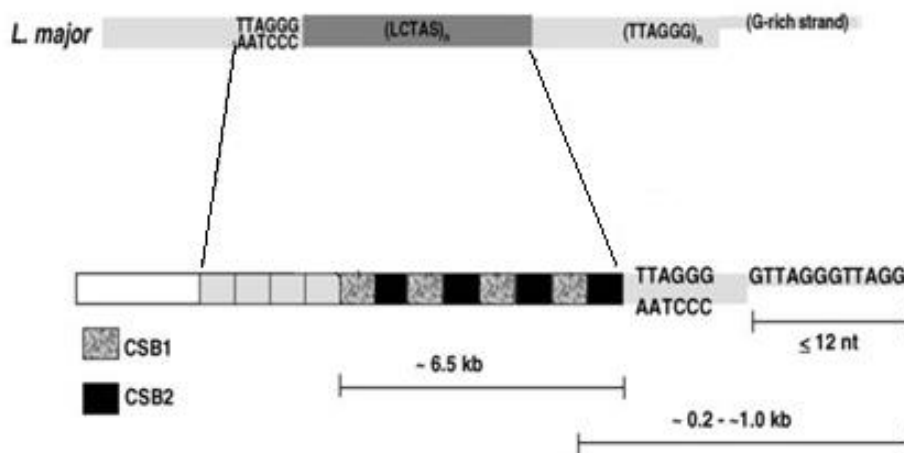


Figure 1.4. Modelo da organização das extremidades cromossômicas em *L. major*. São mostrados a posição e organização das LCTAS (superior). São indicados a ordem dos elementos CSB1 e CSB2 dentro das LCTAS. É mostrado o tamanho médio (kb) dos fragmentos teloméricos e subteloiméricos. Também é mostrada o tamanho estimado das sequências teloméricas e do 3'-G *overhang*. Figura modificada de (CONTE; CANO, 2005).

Ao contrário de outros tripanosomatídeos como *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, as regiões teloméricas e subteloiméricas de *Leishmania* spp. não contém genes, o que sugere que essas regiões, à semelhança de outros eucariotos, são transcricionalmente silenciadas. Em leveduras de brotamento e células humanas, a inserção de genes repórteres nessas posições inibe a transcrição, este evento foi denominado “efeito da posição telomérica” (BAUR et al., 2001; BLASCO, 2007; GOTTSCHLING et al., 1990). Até pouco tempo atrás, se acreditava que a sequência desta região só possuía função estrutural e de silenciamento transcricional. Em algumas espécies de mamíferos e leveduras, foi demonstrado que RNAs longos não codificadores (lncRNA, *long noncoding RNAs*) são originados destas regiões (AZZALIN et al., 2007; BAH et al., 2012; LUKE et al., 2008; SCHOEFTNER; BLASCO, 2008). Em levedura de fissão, esses lncRNA são transcritos a partir das extremidades dos cromossomos e foram caracterizados em quatro espécies diferentes: TERRA (RNAs não codificadores transcritos a partir da fita C-telomérica contendo repetições subteloiméricas e teloméricas), ARIA (RNA não codificador antisense transcrito a partir da fita G-telomérica) e, ARRET e α ARRET (RNAs não codificadores transcritos a partir da região subteloimérica) (Fig. 1.5) (BAH et al., 2012; GREENWOOD; COOPER, 2012).

Em *Leishmania* spp. nenhum destes lncRNAs teloméricos foi identificado até o momento, embora o transcriptoma de *L. major* nas diferentes formas de desenvolvimento

utilizando RNA-Seq já se encontra publicado (DILLON et al., 2015; INBAR et al., 2017; RASTROJO et al., 2013).

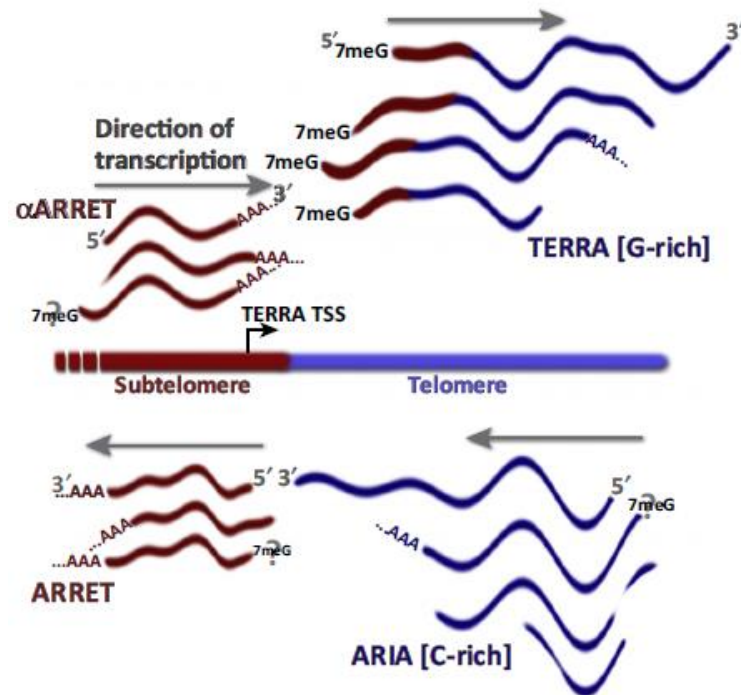


Figura 1.5. Transcriptoma telomérico. Esquema dos RNAs originados a partir das extremidades cromossômicas em eucariotas. Está representada a região subtelomérica (vermelho) e a região telomérica (azul). Figura extraída de (AZZALIN; LINGNER, 2015).

1.6. Long noncoding RNAs com função telomérica

Longos RNAs não codificadores (lncRNAs) foram descobertos há 20 anos em diferentes eucariotas e, desde então, tem-se demonstrado a sua importância como reguladores de diversos processos biológicos, dentre os quais, se encontram os lncRNAs com função telomérica, como é o caso do TER e TERRA e/ou seus similares. Recentemente, nosso grupo de pesquisa descreveu um candidato putativo ao TER de *Leishmania* spp. (VASCONCELOS et al., 2014). Já para o TERRA, sua biogênese e função em diferentes organismos são bem estudados, ao contrário dos seus similares, pouco estudados e descritos apenas em levedura de fissão (BAH et al., 2012; GREENWOOD; COOPER, 2012), aqui vale ressaltar que, há duas décadas, foi demonstrado que os telômeros de diferentes protozoários, incluindo *Leishmania* spp. e outros tripanosomatídeos, são transcritos (RUDENKO; VAN DER PLOEG, 1989). Embora naquela época não tenha sido demonstrado o sítio de início de transcrição e nem de que fita do DNA estes RNAs são originados. Recentemente, Nanavaty e colaboradores (NANAVATY et al., 2017) mostraram que transcritos TERRA são gerados a partir de

regiões teloméricas/subteloméricas, onde se encontram sítios ativos de expressão (ES, *expression sites*) de antígenos virulentos de superfície (VSG, virulent surface antigen) em *T. brucei*, e que a expressão de TERRA é controlada pela proteína TbRAP1, uma proteína telomérica essencial para o silenciamento dos VSGs. Estes resultados abrem precedentes para que a caracterização do TERRA e/ou de seus similares em *L. major* sejam bem sucedidas.

1.6.1. TERRA (*Telomeric Repeat containing RNA*)

Foi descoberto recentemente que os telômeros podem ser controlados pelos lncRNA teloméricos, conhecidos como repetições teloméricas contendo RNAs (TERRA). Estes constituem uma nova classe de RNAs longos não codificadores (AZZALIN et al., 2007; SCHOEFTNER; BLASCO, 2008). Em mamíferos as moléculas TERRA são repetições do tipo 5'UUAGGG 3' que variam de 100pb a 9Kb, e estão presentes em diferentes eucariotos, incluindo humanos, ratos, hamsters, peixes zebra e leveduras, indicando que TERRA é evolutivamente conservado (AZZALIN et al., 2007; IGLESIAS et al., 2011; SCHOEFTNER; BLASCO, 2008). A fita telomérica rica em C serve de molde para o início da transcrição do TERRA, a partir de regiões subteloméricas (NERGADZE et al., 2009; PFEIFFER et al., 2012). A principal RNA polimerase sintetizadora do TERRA é a RNA polimerase II (RNAPII), como demonstrado em mamíferos (SCHOEFTNER; BLASCO, 2008) e, posteriormente, em levedura de brotamento (LUKE et al., 2008). Em humanos e *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), o transcrito maduro TERRA carrega na extremidade 5' um nucleotídeo do tipo 7-metil-guanosine e somente uma fração das espécies de TERRA são poliadeniladas nas extremidades 3', enquanto que, todas as sequências de TERRA em levedura de brotamento são poliadeniladas (AZZALIN et al., 2007; BAH et al., 2012; LUKE et al., 2008; PORRO et al., 2010; SCHOEFTNER; BLASCO, 2008). Em humanos, leveduras e *T. brucei* TERRA mostrou formar híbridos RNA:DNA com o DNA telomérico, que presumivelmente formam uma estrutura telomérica do tipo R-loop. Altos níveis de R-loop teloméricos aumentam a formação de quebras de dupla fita e, assim, promovem a recombinação dos telômeros afetando a integridade das regiões subteloméricas e teloméricas (CUSANELLI; CHARTRAND, 2015; NANAVATY et al., 2017).

TERRA está envolvido na regulação do comprimento e replicação do telômero, resposta a danos no DNA telomérico, mudanças na composição da cromatina telomérica, integridade do telômero e é essencial para a manutenção dos telômero (AZZALIN;

LINGNER, 2015; CHU et al., 2017; MONTERO et al., 2016). Ainda não está bem definido o que regula o número de transcritos TERRA nas células, pois sua abundância é altamente dependente da fase do ciclo celular, do estado de desenvolvimento das células, do comprimento dos telômeros, se a célula se encontra sob condições de estresse, no caso de células tumorais depende da fase de desenvolvimento do tumor e também da estrutura da cromatina telomérica (ARORA; BRUN; AZZALIN, 2011).

1.6.1.1. Regulação da expressão do TERRA

Em humanos, o promotor do TERRA está localizado dentro da região subtelomérica da maioria dos cromossomos. Este fato sugere que mecanismos de regulação comuns controlem a biogênese dos transcritos TERRA provenientes de 18 extremidades cromossômicas independentes (NERGADZE et al., 2009). Porém, recentemente foi demonstrado que apenas uma dessas extremidades cromossômicas transcreve o transcrito do TERRA, proveniente da extremidade 20q (MONTERO et al., 2016). O promotor do TERRA é composto por ilhas CpGs que contém repetições em *tandem* de 37 a 39 pares de bases precedidas de repetições em *tandem* de 61 pares de bases (NERGADZE et al., 2009). Estas ilhas CpGs são metiladas por enzimas de metilação de DNA (DNMT), responsáveis pela adição do radical metil ao carbono 5 da citosina (m⁵C), a fim de regular sua atividade transcricional (FARNUNG; GIULOTTO; AZZALIN, 2010; NERGADZE et al., 2009).

Em geral, ilhas CpGs de eucariotos são regiões repetitivas do genoma contendo pelo menos 50% de nucleotídeos G e C e cujo comprimento é de aproximadamente 200pb (GARDINER-GARDEN; FROMMER, 1987; LARSEN et al., 1992). As ilhas CpGs estão presentes em diferentes regiões do genoma, incluindo o corpo do gene, elementos de transposição e regiões promotoras (GARDINER-GARDEN; FROMMER, 1987; WEBER et al., 2005), podendo ser encontradas na região 5' montante de genes tecido-específicos e de diversos genes que são ubiquamente expressos. Alguns dos *loci* que contém ilhas CpGs intersectando suas regiões promotoras, não contém as regiões conhecidas como TATA *box*, fato que sugere que essas ilhas exercem um papel regulatório na expressão destes *loci*.

Em humanos, ilhas CpGs possuem aproximadamente 1 Kilobases (Kb) de comprimento e sobrepõem regiões promotoras de cerca de 60-70% dos genes (GARDINER-GARDEN; FROMMER, 1987; LANDER et al., 2001). A grande parte das ilhas CpGs em mamíferos são hipometiladas, porém, entre 9 e 25% são hipermetiladas.

Uma pequena fração pode adquirir metilação durante o envelhecimento e, algumas ilhas aparentam ser responsáveis pelo *imprinting* genômico e pela inativação do cromossomo X em humanos (ESTELLER, 2007). Essa alta variação da detecção de metilação dessas regiões, pode ser devido às diferenças nas técnicas utilizadas, à inconsistência da classificação destas ilhas, à difícil identificação de todas as ilhas CpGs, ou ainda, à variação da metilação inerente aos tecidos e tipos celulares analisados por cada grupo de pesquisa (ECKHARDT et al., 2006; GARDINER-GARDEN; FROMMER, 1987; RAUCH et al., 2009).

Além da identificação do promotor do TERRA em humanos e da regulação que exerce na transcrição do TERRA, em *S. cerevisiae*, as proteínas teloméricas Rif1 e Rif2 (RAP1 interacting factor 1 and 2) são encarregadas da regulação da transcrição do TERRA em todos os telômeros e, as proteínas Sir que interagem com Rif, para montar a heterocromatina nos telômeros de leveduras, contribuindo para a regulação da transcrição do TERRA em telômeros que contém elementos subteloméricos Y0 (IGLESIAS et al., 2011). Em *Leishmania* spp., até o momento, não foram identificados nem os transcritos TERRA nem suas possíveis regiões regulatórias. Existem apenas dois trabalhos publicados que caracterizaram ilhas CpGs em *Leishmania* spp.. GUPTA et al., (2015) e DAS et al., (2015), utilizando sequências consenso de ilhas CpGs humanas, que reconhecidamente interagem com receptores do tipo Toll-like receptor 9 (TLR9), encontraram ilhas CpGs de padrão semelhante no genoma de *L. donovani*, as quais são capazes de interagir especificamente com estes receptores na célula hospedeira. Embora tenham sido identificadas ilhas CpGs em *Leishmania* spp., a classificação ou padrão de repetições C e G destas ilhas CpGs é diferente à classificação das ilhas CpGs encontradas no promotor do TERRA.

Análises preliminares *in silico* de bibliotecas RNA-Seq de *L. major* indicam a presença de ilhas CpGs putativas em região subtelomérica em organização semelhante às encontradas nas regiões subteloméricas que expressam o TERRA em humanos (veja em Resultados). Além disso, foi previamente identificado *in silico* um homólogo para a DNA metiltransferase em *Leishmania* contendo o domínio de metilação de resíduos de citosina (m5c, 5-metil citosina) em DNA (PONGER; LI, 2005).

1.6.2. RNA telomerase (TER)

TER é um dos principais componentes do complexo telomerase, ele contém uma pequena sequência molde, a qual é copiada pela telomerase durante a replicação dos telômero (GILSON; GÉLI, 2007; LONDOÑO-VALLEJO; WELLINGER, 2012), além disso, o TER ajuda a montar o complexo RNP (Fig. 1.3) (STONE et al., 2007; ZAPPULLA; CECH, 2004).

A base das atividades bioquímicas do TER é altamente conservada (CHEN; BLASCO; GREIDER, 2000; ZAPPULLA; GOODRICH; CECH, 2005) e todos os TER encontrados até o momento possuem um motivo conservado na sua estrutura secundária, o qual está envolvido na estabilidade, acumulação, localização celular do RNA e montagem com uma região do motivo TRBD das TERTs (LUE, 2004). Isto foi evidenciado pelo descobrimento de mutações no TER que são capazes de abolir a interação entre TER e TERT e que resultam numa incapacidade de manter o tamanho dos telômeros em diferentes organismos, pois estas mutações alteram segmentos conservados da estrutura secundária da molécula de RNA (LIN et al., 2004). Entre os componentes estruturais conservados do TER, está a região TBE (*template boundary element*), envolvida com a interação com a telomerase e está localizada na porção 5' da molécula e a região do molde (GIARDINI et al., 2014), que consiste na sequência reversa complementar da repetição telomérica, com tamanho aproximado de uma repetição e meia (LUE, 2004). Outras regiões importantes que tem sido descritas como importantes na interação TERT-TER, são a região de *pseudoknot*, e o domínio CR4/5 que interage especificamente com o motivo QFP do domínio TRBD da TERT. São de importância também outras regiões conhecidas como *stem loops* que formam a estrutura secundária da molécula. Estes elementos afetam a atividade e processividade enzimática da telomerase (CHEN; GREIDER, 2004; LUE, 2004).

Embora a estrutura do TER seja conservada entre os organismos, seu tamanho e composição da sequência de nucleotídeos varia. O tamanho da sequência primária do TER varia de 47-209nt até 2.2Kb em protozoários ciliados e em *Plasmodium falciparum* e *T. brucei* respectivamente (BLACKBURN; COLLINS, 2011; BRAULT; D'SOUZA; AUTEXIER, 2008; CHEN et al., 2008; GUPTA et al., 2013; SANDHU et al., 2013). Em *L. major* o nosso grupo de pesquisa identificou recentemente um candidato para TER com tamanho de 2.100 nt, denominado LeishTER (Fig. 1.6) (VASCONCELOS et al., 2014). LeishTER foi encontrado em uma combinação de análises *in silico* com resultados de buscas por candidatos em três bibliotecas SL-Seq fornecidas pelo Dr. Peter Myler, nosso colaborador. Bibliotecas SL-Seq a diferencia do convencional sequenciamento seq, é um

pouco mais específico, sendo que utiliza a sequência SL como parâmetro para realizar o sequenciamento. O gene que codifica o TER foi mapeado em um locus sintênico no cromossomo 25 de cinco espécies de *Leishmania* que compartilham sintonia parcial com o locus TER de *Trypanosoma brucei* e um locus contendo um candidato putativo a TER de *Crithidia fasciculata*. O transcrito é modificado por *trans*-splicing e contém no *cap* 5' a sequência líder (SL, spliced leader) e uma cauda polyA no terminal 3', além de um domínio do tipo C/D box snoRNA. LeishTER é expresso em níveis similares em formas promastigotas crescendo em fase logarítmica e estacionária. A forma madura de LeishTER contendo o 5' SL *cap* co-imunoprecipita e co-localiza com o componente protéico da telomerase (TERT) de forma dependente da fase do ciclo celular. A predição da estrutura secundária de LeishTER sugere fortemente a existência de uma sequência molde simples fita localizada próxima ao terminal 5' e um motivo conservado C[U/C]GUCA contido na hélice II, e que representa o elemento TBE responsável por interagir com o domínio de interação com o RNA na telomerase (TRBD, *Telomerase RNA Binding Domain*) (Fig. 1.6) (VASCONCELOS et al., 2014).

A variabilidade do tamanho e sequência dos TER poderia ser uma adaptação evolutiva de cada organismo para permitir maior rendimento do complexo RNP (BLACKBURN; COLLINS, 2011). Atualmente está sendo estudada a interação estrutural entre a TERT e o TER em *L. major* e aparentemente o tamanho do TER confere com a estrutura da TERT (dados não publicados do nosso grupo de pesquisa). O passo seguinte a ser realizado é a caracterização da função do TERT e elucidar sua importância na biologia dos telômeros de *Leishmania* spp..

LmTER

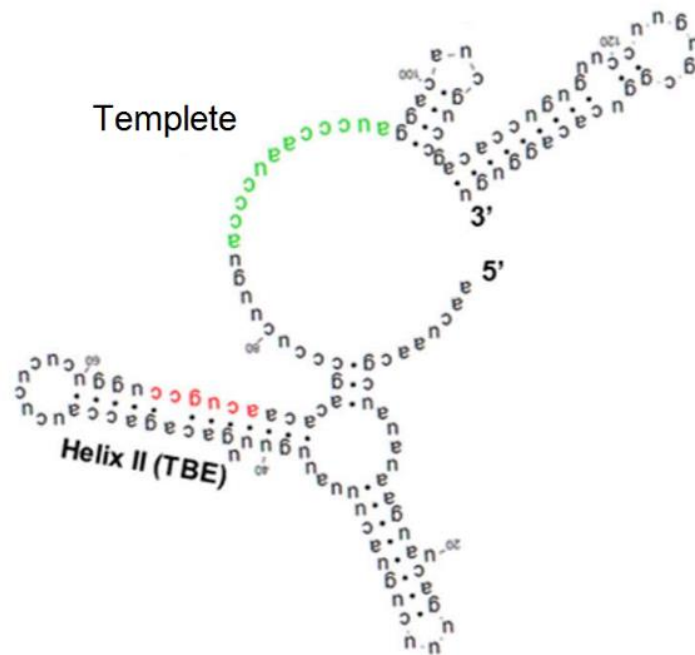


Figure 1.6. Predição da estrutura secundária de TER em *L. major*. Esta representa a Helix II contendo o motivo CCGUCA (vermelho) e a sequência do molde da repetição telomérica (Verde) (Figura extraída de (VASCONCELOS et al., 2014)).

CAPÍTULO 1

2. CARACTERIZAÇÃO DO LONGO RNA TELOMÉRICO NÃO CODIFICADOR TERRA EM *Leishmania major*.

2.1. INTRODUÇÃO

O gênero de *Leishmania* pertence à ordem Kinetoplastida e é caracterizado pela presença de uma organela que carrega DNA mitocondrial, chamada de kinetoplasto. O gênero de *Leishmania* compreende parasitos dimórficos causadores da Leishmaniose, uma doença negligenciada transmitida pelo flebotomíneo (*Phlebotomus*). Leishmaniose é encontrada em áreas focais de mais de 90 países no trópico, subtropical (GULL, 2001; JOHNSTON et al., 1999) e sur da Europa (ANTINORI; SCHIFANELLA; CORBELLINO, 2012; PREVENTION, [s.d.]). Até o momento, não há vacina nem tratamento eficiente para as diferentes manifestações da leishmaniose. Atualmente, vários estudos estão sendo desenvolvidos para entender a fisiologia do parasito, em busca de descobrir novas estratégias que possam contribuir para o tratamento ou prevenção da leishmaniose, portanto, estudos que contribuam com o entendimento da biologia e fisiologia da *Leishmania* spp., poderiam providenciar uma possibilidade para encontrar novos alvos terapêuticos. Um dos possíveis alvos terapêuticos poderia ser encontrado na biologia telomérica, sendo que sua principal função é estabilizar o genoma o qual influencia diretamente com a proliferação celular (SEKARAN; SOARES; JARSTFER, 2014).

Telômeros são estruturas nucleoprotéicas formadas por interação de proteínas e sequências de DNA repetitivas na codificantes localizadas nas extremidades dos cromossomos (BLACKBURN; GALL, 1978; PRYDE; GORHAM; LOUIS, 1997). O DNA telomérico é composto por DNA fita dupla (uma rica em G e outra rica em C) e DNA fita simples (rica em G) a qual forma uma protuberância denominada de 3' G-overhang (BLACKBURN, 2005; CHAN; BLACKBURN, 2004; HENDERSON; BLACKBURN, 1989; WRIGHT et al., 1997). Os telômeros estão presentes em células de eucariotos e são responsáveis por proteger os cromossomos da degradação, recombinação e fusão, assegurando que a informação genética seja corretamente copiada durante a duplicação celular. Eles são associados a vários importantes processos biológicos, como o controle da divisão celular, envelhecimento, regulação da transcrição, integridade do genoma e manutenção da arquitetura nuclear (CHAN; BLACKBURN,

2004; DMITRIEV; PETROV; DONTSOVA, 2003). Se acreditava que os telômeros tinham apenas função estrutural para proteger os cromossomos, no entanto, algum tempo atrás, foi demonstrado que em algumas espécies de mamíferos e leveduras, longos RNA non-codificantes são originados a partir dos telômeros (AZZALIN et al., 2007; BAH et al., 2012; LUKE et al., 2008; SCHOEFTNER; BLASCO, 2008)(BAH et al., 2012; LUKE et al., 2008). Em levedura de fissão, quatro diferentes lncRNA, denominados transcriptoma telomérico, são transcritos a partir das extremidades teloméricas e já foram classificados: (i) TERRA, (*Telomeric Repeat containing RNA*), RNA transcrito a partir da fita telomérica rica em C contendo região subteloamérica e telomérica. (ii) ARIA RNA transcrito a partir da fita telomérica rica em G, (iii) ARRET e (iv) α ARRET transcritos a partir de regiões subteloamérica (BAH et al., 2012; GREENWOOD; COOPER, 2012).

A biogênese e função do TERRA tem sido estudada em diferentes organismos, diferente dos outros membros do transcriptoma telomérico, os quais somente foram descritos em levedura de fissão (BAH et al., 2012; GREENWOOD; COOPER, 2012). Em humanos, as moléculas do TERRA são compostas por repetições de 5'UUAGGG 3'. O TERRA está presente em diferentes eucariotos, incluindo ratos, hamsters, peixes zebra e leveduras, indicando que é conservado evolutivamente (AZZALIN et al., 2007; IGLESIAS et al., 2011; SCHOEFTNER; BLASCO, 2008). A fita telomérica rica em C, serve como molde para iniciar a transcrição do TERRA na região subteloamérica (NERGADZE et al., 2009; PFEIFFER et al., 2012). A principal enzima envolvida na transcrição do TERRA é a RNA polymerase II (RNAPII) (LUKE et al., 2008; SCHOEFTNER; BLASCO, 2008). Em humanos e *S. cerevisiae*, transcritos maduros do TERRA carregam na extremidade 5' o 7-methyl-guanosine. Além disso, todos os transcritos TERRA são poliadenilados em levedura de brotamento, no entanto em humanos e leveduras de fissão apenas uma fração é poliadenilada (AZZALIN et al., 2007; BAH et al., 2012; LUKE et al., 2008; PORRO et al., 2010; SCHOEFTNER; BLASCO, 2008).

Os transcritos do TERRA estão envolvidos na regulação do comprimento telomérico e são essenciais para a manutenção dos telômeros, resposta a danos nos telômeros, e regulação da composição da cromatina (AZZALIN; LINGNER, 2015; MONTERO et al., 2016). Até o momento não foi bem definido o que regula os níveis dos transcritos TERRA, isso se deve a sua abundância depender de vários fatores, como ciclo celular, estágio de desenvolvimento celular, comprimento do telômero, condição de estresse em que a célula esteja submetida e também do estágio de desenvolvimento do

tumor em células tumorais (ARORA; BRUN; AZZALIN, 2011). Desta forma o presente trabalho tem como um dos objetivos, contribuir com o entendimento do papel do TERRA na biologia telomérica, nas três fases de desenvolvimento da *Leishmania major*.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo geral

- Identificar e caracterizar a função do longos RNAs telomérico não codificador TERRA em *Leishmania major*.

2.2.2. Objetivos específicos

- Identificar *in silico*, a possível presença do TERRA, assim como a existência de ilhas CpGs putativas em regiões subteloméricas das três formas de desenvolvimento de *L. major*.

- Confirmar experimentalmente a presença do TERRA nas três formas de desenvolvimento de *L. major*.

- Caracterizar o TERRA nas três formas de desenvolvimento de *L. major*.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. Material biológico e condições de crescimento de *Leishmania major*

Para todos os experimentos foi utilizada a espécie *Leishmania major* cepa *L. major* (MHOM/IL/1980/FRIEDLIN) cedida pelo CLIOC (coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz) sob a sigla IOC/L2821. Formas amastigotas derivadas de lesão em patas de camundongo linhagem balb/c foram preparadas livres de contaminantes e de outras células seguindo protocolo descrito anteriormente (BARBIÉRI; DOINE; FREYMULLER, 1990). Estas células foram obtidas em colaboração com os grupos de pesquisa da Profa. Dra. Selma Giorgio Depto. Biologia Animal, UNICAMP e do Prof. Helio Langoni, da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP Botucatu.

Formas promastigotas derivadas de formas amastigotas, foram cultivadas em estufa incubadora com temperatura de 28°C, utilizando o meio de cultura comercial 199 1X, pH 7.3 (Cultilab) suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino (Cultilab) inativado pelo calor (KAPLER; COBURN; BEVERLEY, 1990) e, adicionados solução 1X de antibióticos/antimicóticos (Cultilab). Formas metacíclicas foram obtidas de formas promastigotas na fase estacionária de crescimento (aproximadamente 7-8 dias). Foram utilizadas culturas com 2×10^8 promastigotas de *L. major* e as formas metacíclicas foram separadas das promastigotas utilizando lecitina de amendoim (Lectin, Arachis hypogaea, peanut) (100µg/ml) (Sigma) seguindo o protocolo descrito anteriormente (DA SILVA; SACKS, 1987).

Para estudar a expressão diferencial de TERRA durante a manutenção dos parasitos in vitro, formas promastigotas foram cultivadas por até 6 repiques sucessivos (passagens 1-6) em meio de cultura, nas condições acima descritas. Os repiques foram realizados a cada 4 dias, diluindo-se as culturas em $0,1 \times 10^7$ de meio novo. As formas metacíclicas derivadas destes promastigotas foram obtidos como descrito acima.

2.3.2. Caracterização do TERRA em *Leishmania major*

Esta parte do trabalho experimental foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Claus Maria Azzalin do instituto de Medicina Molecular Lisboa, Portugal, o primeiro a descrever os lncRNAs TERRA (AZZALIN et al., 2007).

2.3.3. Análise *in silico* da presença do TERRA e/ou seus similares e ilhas CpGs putativas em *Leishmania major*

Esta parte do trabalho foi realizada com a colaboração do Bioinformata Dr. Elton José Rosas de Vasconcelos (College of Veterinary Medicine at Western University of Health Sciences Pomona. CA, EUA), que indicou as diretrizes de como seriam realizadas as análises e também escreveu programas e *scripts* que auxiliaram nestas buscas. Aqui foram utilizados sequenciamento do transcriptoma de *L. major* utilizando bibliotecas de SL-Seq. O SL-Seq, é uma nova metodologia descrita recentemente (CUYPERS et al., 2017) que se baseia no sequenciamento dos transcritos maduros que apresentam sinal SL na região 5'UTR do gene (Fig. 2.1). Essas bibliotecas foram disponibilizadas pelo nosso colaborador Dr. Peter Myler, do Seattle Biomedical Institute (Estado Unidos de America). Elas foram construídas a partir de transcritos de RNA total das três formas de desenvolvimento de *L. major* (amastigota, promastigota e metacíclica) (Myler, P dados não publicados). Para a identificação dos possíveis transcritos TERRA utilizou-se como referência a presença do sinal SL nas extremidades cromossômicas dos 36 cromossomos de *L. major*. Para a identificação das regiões subteloméricas em cada uma das extremidades cromossômicas, utilizou-se as sequências dos blocos conservados CSB1 e CSB2 (FU; BARKER, 1998).

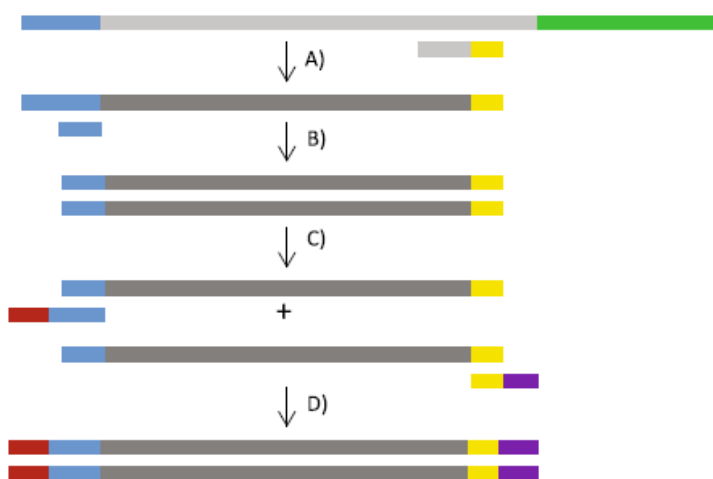


Figure 2.1. Resumo da metodologia SL-Seq para análise de transcritos maduros nas três formas de desenvolvimento de *L. major*. (A) síntese da primeira fita de cDNA com Superscript III utilizando iniciadores com sequência parcialmente randômica (7 nucleotídeos, cinza), e parcialmente fixa (amarelo). Degradação da fita de RNA com RNase H, deixando uma molécula de cDNA de fita simples. (B) Síntese da segunda fita de cDNA utilizando iniciadores para SL (azul escuro). (C + D) Amplificação do cDNA por PCR com iniciadores que contém adaptadores (vermelho e roxo) tornando a biblioteca compatível com o kit de índice Nextera XT (Illumina) para posterior sequenciamento. (Figura modificada de (CUYPERS et al., 2017)).

Para visualização dos resultados provenientes da análise de *data mining* por meio dos *ad hoc* PERL scripts foi utilizado o *genome browser* ARTEMIS (do genoma de *Leishmania major*) (RUTHERFORD et al., 2000). Quando identificados os possíveis transcritos do TERRA cada um destes foram: 1) individualmente analisados usando-se Blastn contra a base de dados de nucleotídeos do NCBI, 2) de posse dos potenciais candidatos também foi utilizado o algoritmo INFERNAL (NAWROCKI; EDDY, 2013) contra uma base de modelos de covariância do Rfam, em busca de similaridade tanto de sequência primária quanto de estrutura secundária dos TERRA e /ou seus similares de outros organismos. O número total de transcritos TERRA foi normalizado calculando-se o RPKM (Reads Per Kilobase Million). A medida das leituras por RPKM reflete a concentração molar de um transcrito na amostra inicial, normalizando o comprimento do RNA pelo número total de leituras na amostra, isto facilita a comparação transparente dos níveis de transcritos tanto dentro como entre as amostras (MORTAZAVI et al., 2008). Finalmente, após estas análises estes resultados foram validados por Northern blot e RT-PCR (Ver próximos tópicos).

Em relação à identificação das ilhas CpG foi utilizado o software CpGi130 baseadas nas ilhas CpG previamente descritas nos promotores de TERRA em humanos (NERGADZE et al., 2009). Estas ilhas são compostas de repetições em tandem de 37 a 39 pares de bases precedidas de repetições em tandem de 61 pares de bases (NERGADZE et al., 2009). Após a identificação das ilhas CpGs putativas, as sequências foram analisadas utilizando-se ferramentas disponibilizadas online (“CpG Islands”, [s.d.], “SoftBerry - CpGfinder HELP”, [s.d.]), para confirmar que de fato possuem características de ilhas CpG.

2.3.4. Northern blot

Para demonstrar a existência e tamanho do TERRA e/ou seus similares, foram realizados ensaios de *Northern blot* utilizando RNA total de *L. major* nas formas amastigota, promastigota e metacíclica extraídos com Trizol (Invitrogen) seguindo-se as recomendações do fabricante. Os RNAs foram tratados três vezes com DNase I (Fermentas®) para certificar que não continham contaminação com DNA genômico, e como controle negativo foi utilizado RNA total tratado com DNase I e RNase A. os RNAs (5 µg) foram fracionados em géis desnaturastes (29:1, acrilamida bisacrilamida) contendo 8 M de uréia. Os RNAs fracionados foram transferidos para membranas de Nylon Hybond N+ e hibridizados utilizando as sequências teloméricas de ambas as fitas

(rica em G e rica em C) marcadas com dioxigenina (DIG), e reveladas com anticorpo anti-DIG por quimiluminescência (reagentes CPD Star), seguindo o protocolo do fabricante (Roche®). Para identificar transcritos da fita G foi utilizada a sonda DIG-TEL-C e para identificar transcritos da fita C foi utilizada a sonda DIG-TEL-G (Tabela suplementar 1) (AZZALIN et al., 2007).

2.3.5. RNA-FISH

Foram utilizadas 1×10^6 parasitas na fase promastigota. Primeiramente os parasitos foram lavados com PBS 1X para eliminar o meio de cultura. Em seguida, as células foram fixadas em 2% de formalina por 10 minutos, seguido de permeabilização com Triton X-100 0,5% e várias lavagens com PBS 1X. Por fim, as células foram depositadas nas lâminas e desidratadas em series de álcool por 5 minutos cada, a temperatura ambiente 70%, 90% e 100%, e posteriormente deixadas secar a temperatura ambiente. Para preparar a sonda de DNA telomérico marcado com cy3-dCTP, foi utilizado o Sistema RadPrime DNA labeling (Invitrogen), e o cy3-dCTP foi obtido da Perkin-Elmer. A sonda de DNA marcado foi desnaturada a 80°C por 5 min e rapidamente deixada no gelo. Para hibridização, 10 µl da sonda foi depositada sobre as células pré-fixadas nas lâminas as quais foram cobertas com uma lamínula selada com rubber cement. As reações foram incubadas a 37°C *overnight* em câmara úmida. Após a hibridização as células foram lavadas em 2X SSC, e o DNA contido no núcleo e no citoplasto foi contracorado com DAPI / 2X SSC por 5 min. a temperatura ambiente seguido de lavagem com 2X SSC. As imagens foram capturadas usando o microscópio de fluorescência Zeiss Axiovert 200M, aumento 63X utilizando o software ZEISS ZEN Microscope Software (blue edition).

2.3.7. Análise da expressão do TERRA

Para a verificação da expressão dos possíveis transcritos TERRA utilizando RT-PCR foram utilizados iniciadores cromossomo-específicos (Tabela suplementar 1).

O isolamento de RNA total das diferentes amostras foi feito seguindo-se as recomendações do fabricante do reagente Trizol (Invitrogen). Foram utilizados 10 mL do cultivo de *L. major* em cada uma das formas de desenvolvimento. Após a extração do RNA total, 20 µg foram tratados com 2 µl de DNase I *Amplification* Grade (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante para remoção total de DNA genômico das amostras. A concentração e pureza do RNA foram avaliadas por espectrofotometria de absorção (OD_{260 nm}), utilizando o equipamento Epoch (BioTek). Finalmente, a ausência

de DNA genômico nas amostras de RNA total foi confirmada por meio da realização de PCR utilizando iniciadores específicos para um gene endógeno (alpha-tubulina acc#AL359777). O RNA total livre de DNA, foi utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA utilizando o iniciador Telômero-R (Tabela suplementar 1) que contém repetições teloméricas. Para a síntese da primeira fita foi utilizado o kit Improm II (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Adicionalmente, um controle sem molde (RNA) e um sem a transcriptase reversa foram obtidos para serem utilizados como controles negativos. Para as reações de RT-PCR, foram analisados transcritos originados das extremidades dos cromossomos 03, 09, 10, 24, 29 (Tabela suplementar 1). Todas as reações foram realizadas em um termociclador convencional.

Para checar se os transcritos maduros de TERRA de *L. major* são poliadenilados, foi realizada a seleção das diferentes populações por afinidade à oligodT para a síntese da primeira fita de cDNA, utilizando o kit Improm II (Promega), seguindo as recomendações do fabricante (Promega), seguido de ensaio de RT-PCR utilizando os iniciadores cromossomo-específicos.

2.3.8. PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) para validação de alterações na expressão das extremidades cromossômicas

Para a utilização da técnica RT-qPCR foram utilizados os mesmos cDNAs utilizados para a análises de RT-PCR, onde a primeira fita foi sintetizada usando oligodT. Para a PCR quantitativa, o protocolo utilizou mix de reação contendo 11,75µL de ddH₂O livre de DNase/RNase (Sigma), 0,5µL do iniciador *foward* (10µM), 0,5µL iniciador *reverse* (10µM) e 6,25 µL de *Power UP SYBR Green mix* (Applied Biosystems). 1µL do cDNA sintetizado foi adicionado a cada reação. O equipamento utilizado foi o *QuantStudio 12K* (Life Technologies). Curvas de dissociação foram incluídas em todas as amplificações para assegurar a produção um único amplicon. Foram realizadas triplicatas técnicas com uma amostra biológica. O fator de normalização foi obtido através da utilização do gene endógeno RPA-1 (Replication Protein A, subunit 1, GenBank acc# AY493356), pois segundo a base de dados TryTrip a expressão deste gene não tem muita variação entre as diferentes formas de desenvolvimento da *Leishmania*. As análises foram realizadas seguindo o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

2.3.6. Southern blot

DNA genômico de *Leishmania major* nas formas amastigota, promastigota (passagem 1-6) e metacíclica (passagem 1-6) foi extraído utilizando o protocolo de rápido isolamento de DNA (MEDINA-ACOSTA; CROSS, 1993) 1µg de cada DNA foi digerido utilizando a enzima *Rsa*-I (*Afa*-I) de forma a liberar os fragmentos teloméricos (CONTE; CANO, 2005). Os DNAs digeridos foram fracionados em gel de agarose 0.8% em tampão TBE 1X. Os DNA fracionados foram transferidos para membranas de Nylon Hybond N+, hibridizados com a sonda DIG-TEL-C (Tabela suplementar 1) seguido de revelação com anticorpo anti-DIG usando quimiluminescência (reagentes CPD Star), seguindo o protocolo do fabricante (Roche®).

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1. Identificação e caracterização molecular de lncRNA do tipo TERRA em *L. major* baseados nos dados das bibliotecas SL-Seq

Com a finalidade de encontrar transcritos do tipo TERRA a partir das extremidades cromossômicas de *L. major*, análises *in silico* foram realizadas utilizando-se o *genome browser* ARTEMIS (do genoma de *Leishmania major*) (RUTHERFORD et al., 2000) e três bibliotecas independentes de SL-Seq das formas amastigota, promastigota e metacíclica (disponibilizados pelo colaborador Dr. Peter Myler, do Seattle Biomedical Institute).

É importante ressaltar que o sequenciamento SL-Seq mostra todos os sinais SL do genoma de *L. major* como um marcador do processo de *trans-splicing* na maturação dos RNAs (MILLER; LANDFEAR; WIRTH, 1986). Para identificação dos loci TERRA as buscas foram baseadas nas características destes RNAs nas extremidades cromossômicas de outros organismos. Os loci de onde se originam transcritos TERRA são caracterizados por possuir do centro para o término do cromossomo (na ordem 5' → 3') regiões promotoras contendo ilhas CpGs, regiões subteloméricas e repetições teloméricas TTAGGG (AZZALIN et al., 2007; NERGADZE et al., 2009).

Para identificar regiões subteloméricas em *L. major* com as características do TERRA em humanos, primeiramente foram realizadas buscas no genoma de *L. major*. Nestas análises foram avaliadas as extremidades dos braços esquerdos e direitos dos 36 cromossomos em busca de sequências conservadas já caracterizadas como componentes de regiões subteloméricas de *L. major* denominados CSB (*Conserved Sequence Boxes*) (FU; BARKER, 1998). Os resultados mostraram que nem todas as extremidades cromossômicas de *L. major* possuem elementos subteloméricos CSB. As CSB foram encontradas nas extremidades de 20 braços esquerdos e nas extremidades de 25 braços direitos (Tabela 2.1). Ilhas CpGs putativas também foram identificadas com base nas sequências dos promotores de TERRA em humanos. Elas compreendem repetições em *tandem* de 39 e 37 pares de bases, precedidas de repetições em *tandem* de 61 pares de bases (NERGADZE et al., 2009). Neste caso, as buscas foram realizadas em ambas as extremidades (braços esquerdos e direitos) dos 36 cromossomos do parasito. Foram encontradas candidatas a ilhas CpG em poucas extremidades cromossômicas, 6 em braços esquerdos e 8 em braços direitos (Tabela 2.2).

Tabela 2.1. Presença de CSB nas extremidades cromossômicas no genoma de *L. major*.

Braço esquerdo	Braço direito
4,6,10,11,14,17,18,19,20,22, 23,25,26,28,30,31,32,33,34,36	5,6,7,9,10,12,13,14,15,16,19,20,21, 23,25,26,27,28,29,30,32,33,34,35,36

Tabela 2.2. Presença de ilhas CpG putativas nas extremidades cromossômicas no genoma de *L. major*.

Braço esquerdo	Braço direito
10,20,25,27,31,32	1,5,10,12,14,19,33,36

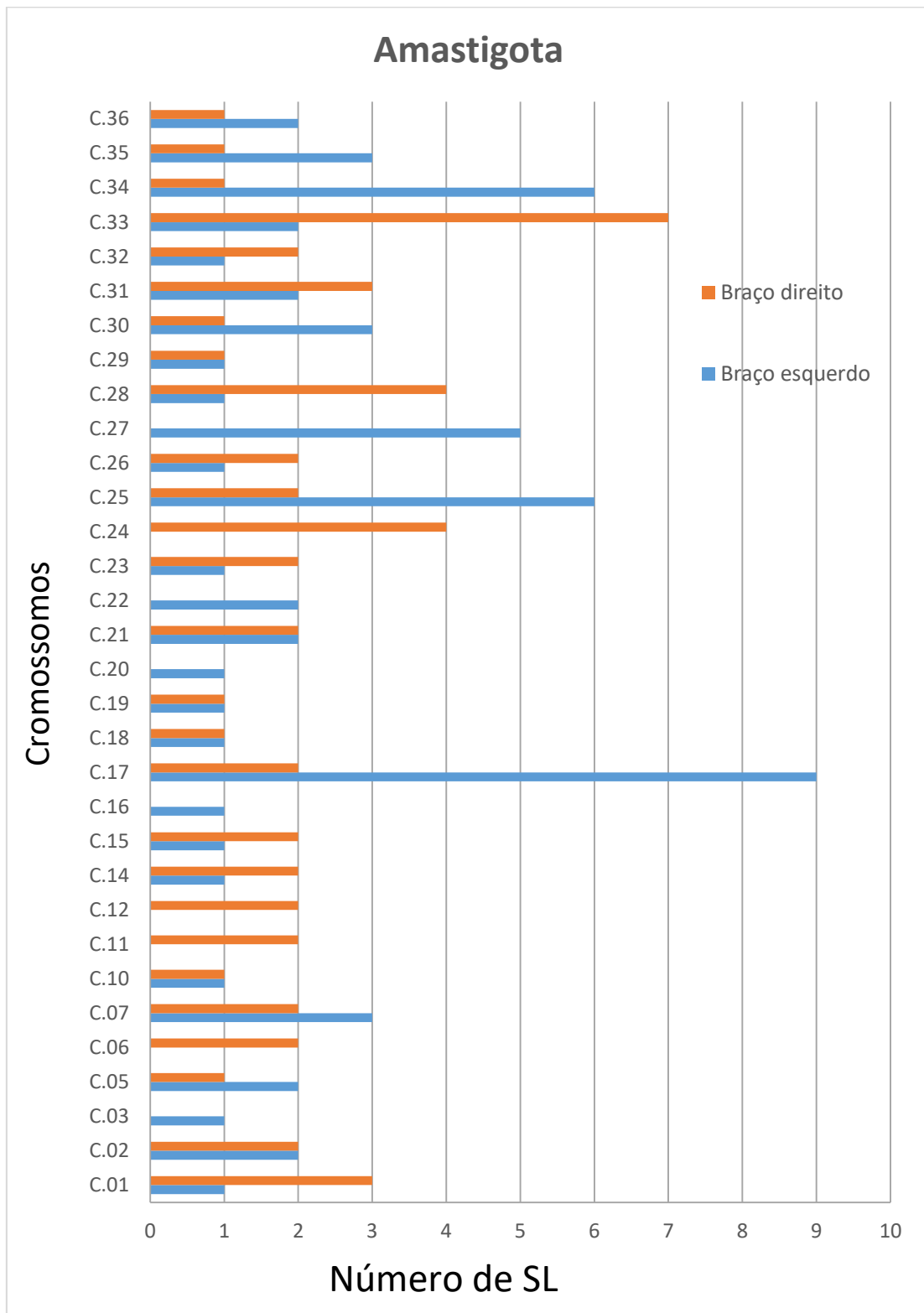
A busca por transcritos originados nestas regiões foi realizada com base na presença de sinais de início de transcrição denominados de sequência líder (SL, *Spliced Leader Sequence*). Esta SL também denominada de mini-exon é inserida na extremidade 5' a montante do início do transcrito como um sinal de maturação por *trans*-splicing do RNA mensageiro em *Leishmania* spp. e em outros tripanosomatídeos (AGAMI; SHAPIRA, 1992; BORST, 1986; LANDFEAR; WIRTH, 1985; MILLER; LANDFEAR; WIRTH, 1986). As análises mostraram sinais de transcrição para a fita telomérica rica em G nas três formas de desenvolvimento do parasito, sugerindo que poderiam se tratar de transcritos TERRA (Anexo 1). Os resultados das análises *in silico* das três bibliotecas SL-Seq demonstrou que na forma amastigota das 72 extremidades cromossômicas 55 possuem sinal SL em região subtelomérica, sendo 28 no braço esquerdo e 27 no braço direito; na forma promastigota, 38 extremidades cromossômicas possuem sinal SL em região subtelomérica, sendo 17 no braço esquerdo e 21 no braço direito e finalmente na forma metacíclica, 50 extremidades cromossômicas possuem sinal SL em região subtelomérica sendo 23 no braço esquerdo e 27 no braço direito (Tabela 2.3). Em amastigota das 55 extremidades cromossômicas 23 apresentam apenas um sinal SL, sendo 14 no braço esquerdo e 9 no braço direito (Fig. 2.1A). Em promastigota, das 38 extremidades cromossômicas com sinal SL 17 apresentam apenas um sinal SL, sendo 9 no braço esquerdo e 8 no braço direito (Fig. 2.1B), e em metacíclica das 50 extremidades cromossômicas com sinal SL, 19 apresentam apenas um sinal SL, sendo 10 no braço esquerdo e 9 no braço direito (Fig. 2.1C). Interessantemente em algumas extremidades foram encontradas mais de um sinal SL localizados a montante ou em região

subtelomérica. Por exemplo, o braço direito do cromossomo 2 nas três formas de desenvolvimento apresenta dois sinais SL, um a 1.161 pb da repetição telomérica e um localizado a 616 pb de extremidade cromossômica, sugerindo que possivelmente outras espécies de lncRNA teloméricos como por exemplo o α ARRET sejam transcritos a partir dessas regiões subteloméricas mais internas (BAH et al., 2012; GREENWOOD; COOPER, 2012).

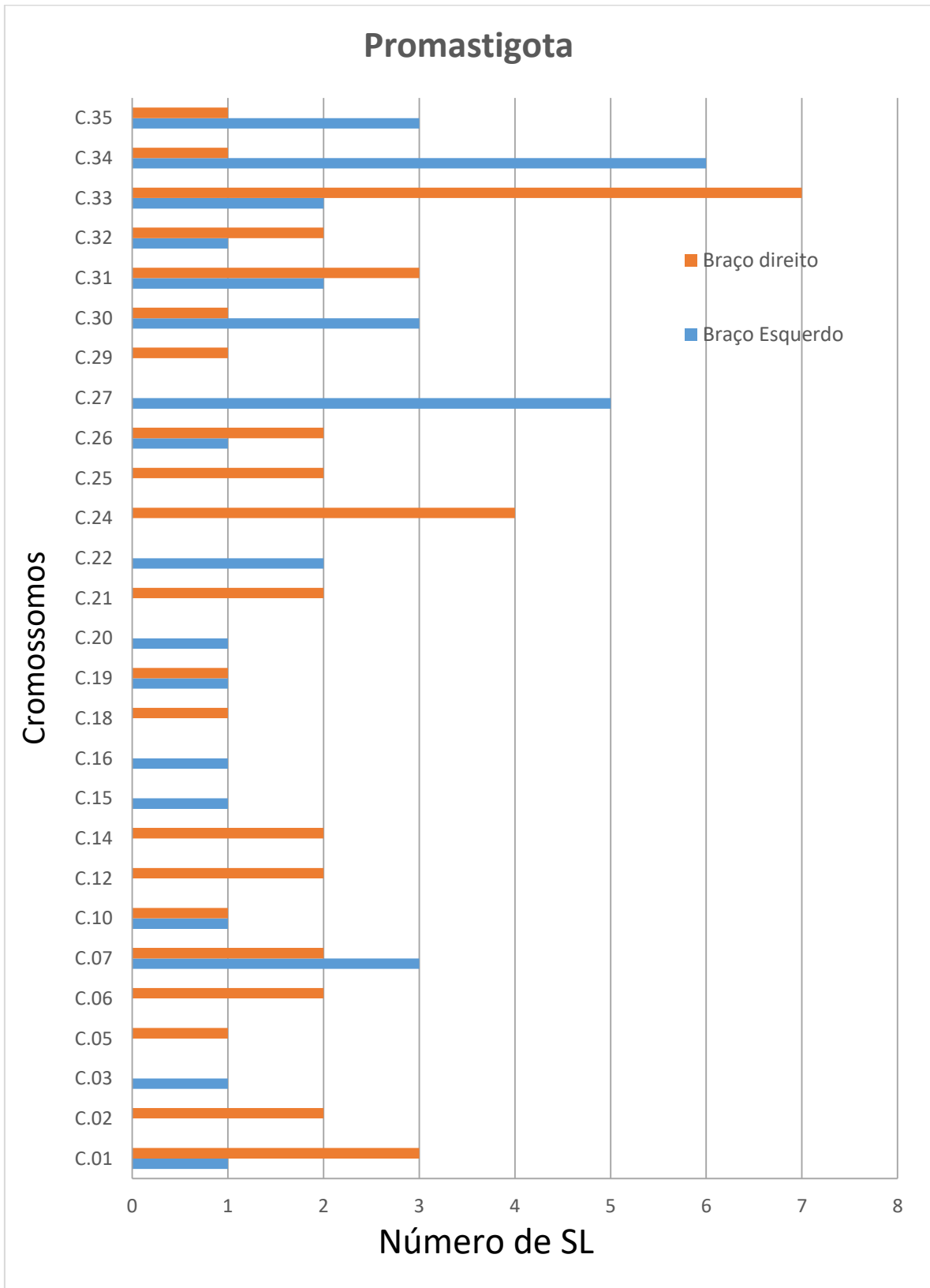
Tabela 2.3. Presença de sinal SL nas extremidades cromossômicas das três formas de desenvolvimento de *L. major*.

Forma	Braço esquerdo	Braço direito
Amastigota	1,2,3,5,7,10,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36	1,2,5,6,7,10,11,12,14,15,17,18,19,21,23,24,25,26,28,29,30,31,32,33,34,35,36
Promastigota	1,3,7,10,15,16,19,20,22,26,27,30,31,32,33,34,35	1,2,5,6,7,10,12,14,18,19,21,24,25,26,29,30,31,32,33,34,35
Metacíclica	1,2,3,6,7,10,15,16,18,19,20,21,22,26,27,29,30,31,32,33,34,35,36	1,2,5,6,7,10,11,12,14,15,17,18,19,21,23,24,25,26,28,29,30,31,32,33,34,35,36

A



B



C

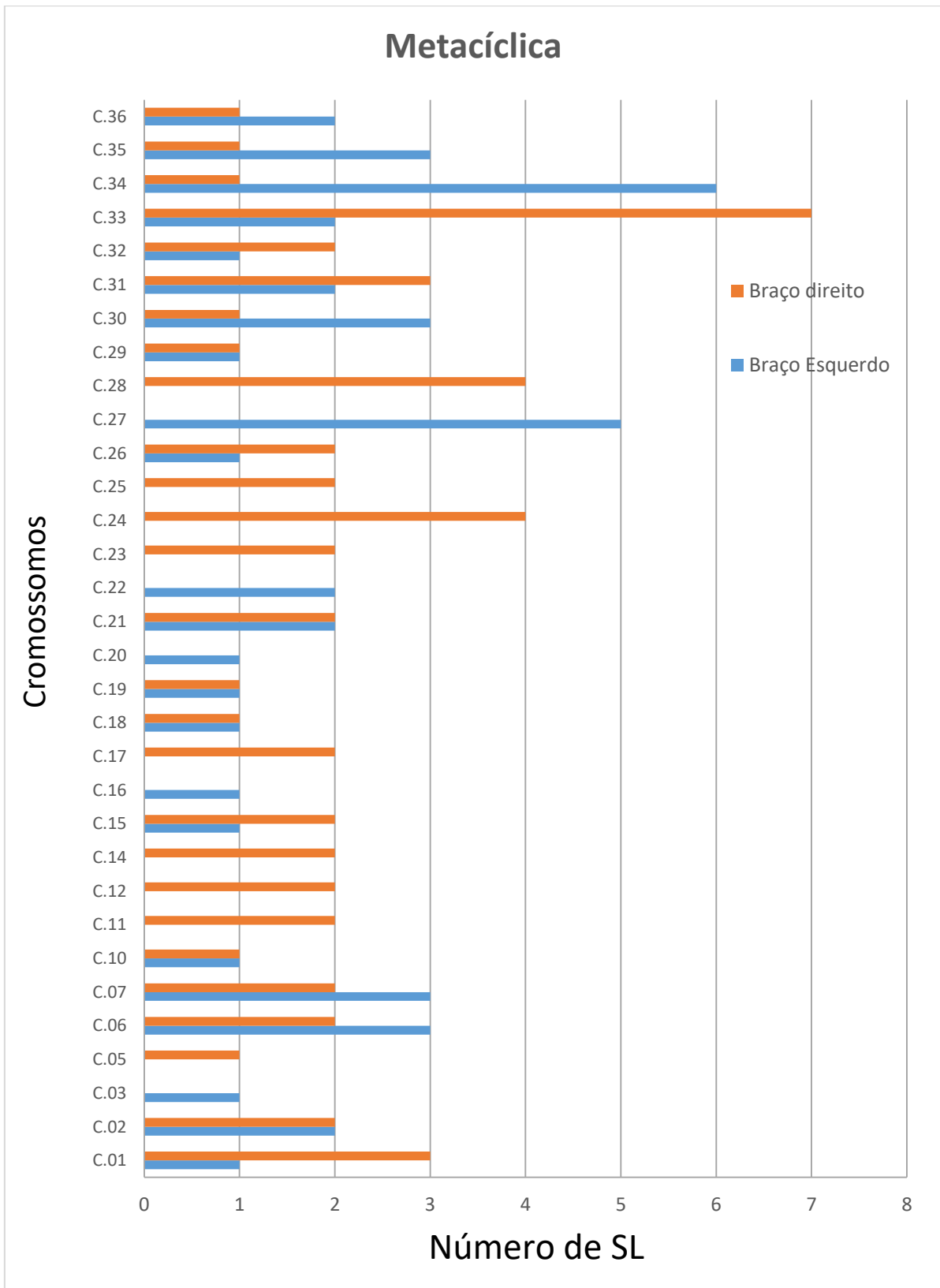


Figura 2.1. Número de sinais SL em cada uma das extremidades cromossômicas nas três formas de desenvolvimento de *L. major*. amastigota (A), promastigota (B) e metacíclica (C).

Com o intuito de caracterizar apenas os possíveis transcritos TERRA, as análises seguintes foram baseadas considerando somente o sinal SL que se encontrava mais próximo das repetições teloméricas (Fig. 2.2). Em seguida, a partir do sinal SL detectado em região subteloamérica, foram estimados os tamanhos dos possíveis transcritos TERRA baseando-se nos dados do genoma de *L. major* utilizando o *genome browser* ARTEMIS. O tamanho dos transcritos variou entre 500 e 2500 nucleotídeos, sendo que apenas a extremidade direita do cromossomo 30 apresentou um transcrito de aproximadamente 6.000 nucleotídeos de comprimento (Fig. 2.3). Os tamanhos aqui apresentados são relativos, pois apenas foi identificado o sítio de início de transcrição, demarcado pelo sinal de SL, sendo que o terminal 3' de cada transcrito foi baseado nos dados do genoma de *L. major*. A variação de tamanho dos possíveis transcritos TERRA está de acordo com transcritos TERRA já descritos em outros eucariotos (AZZALIN et al., 2007; IGLESIAS et al., 2011; SCHOEFTNER; BLASCO, 2008).

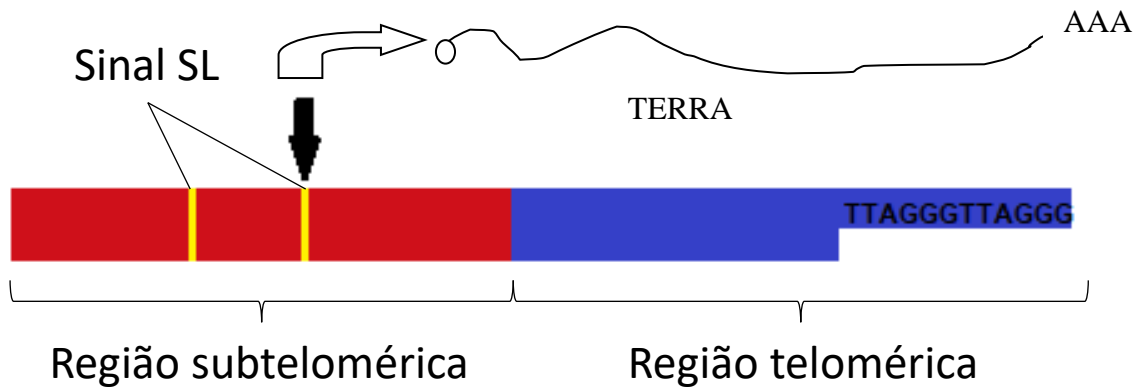
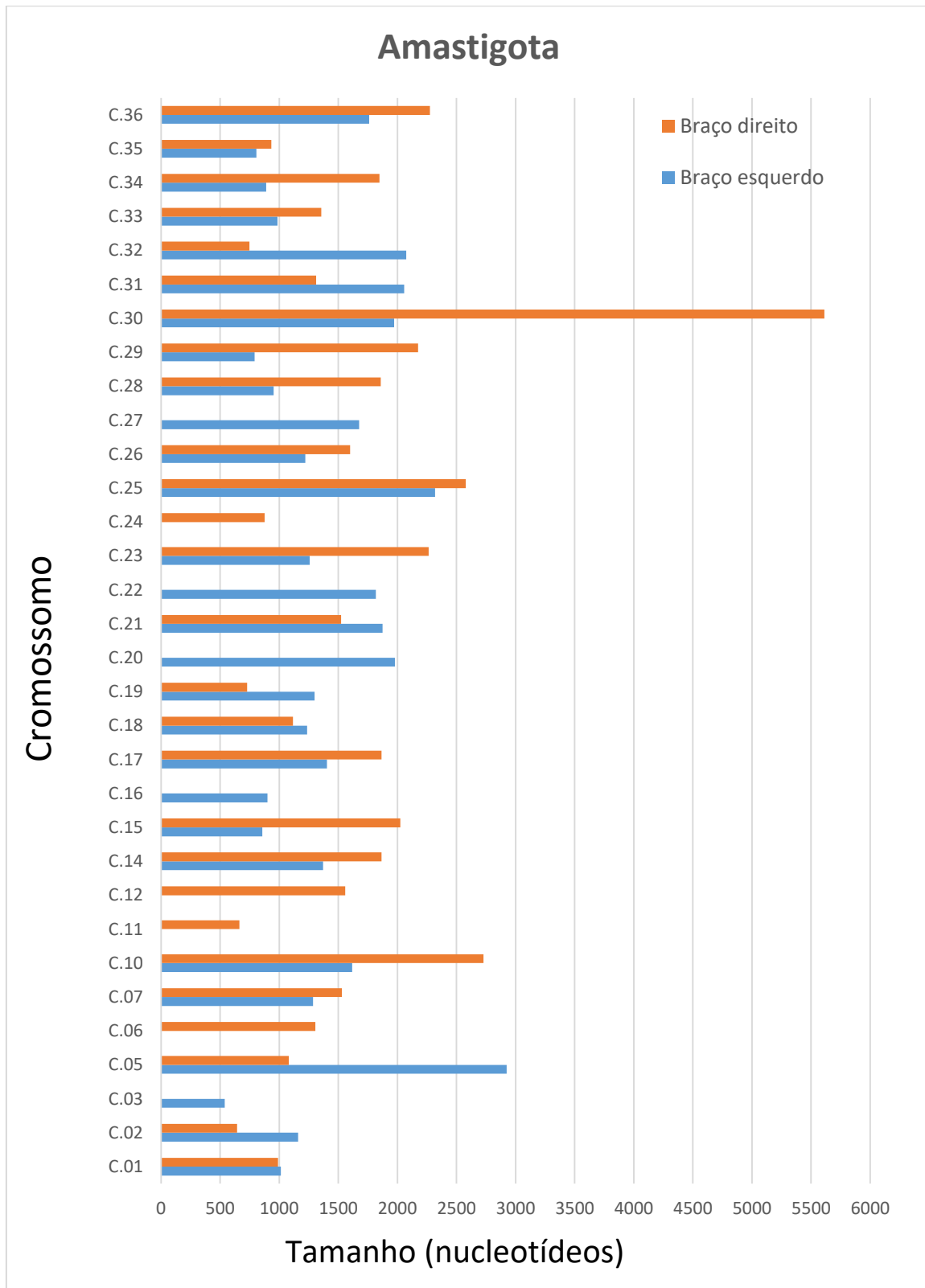
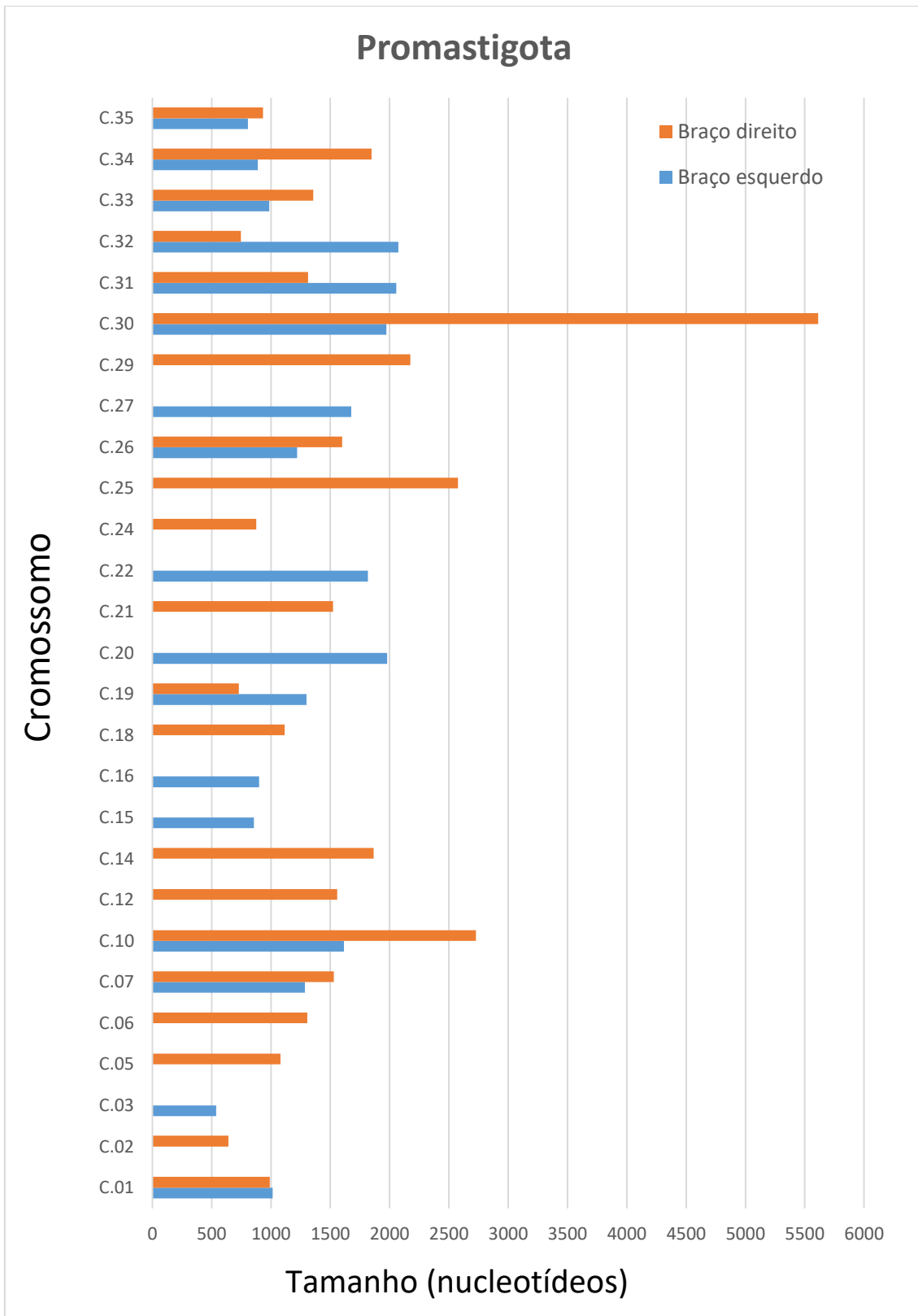


Figura 2.2. Esquema de uma extremidade cromossômica com presença de mais de um sinal de SL (amarelo) na região subteloamérica (vermelho). Seta indica o sinal SL mais próximo da região telomérica (azul) onde inicia a transcrição do TERRA.

A



B



C

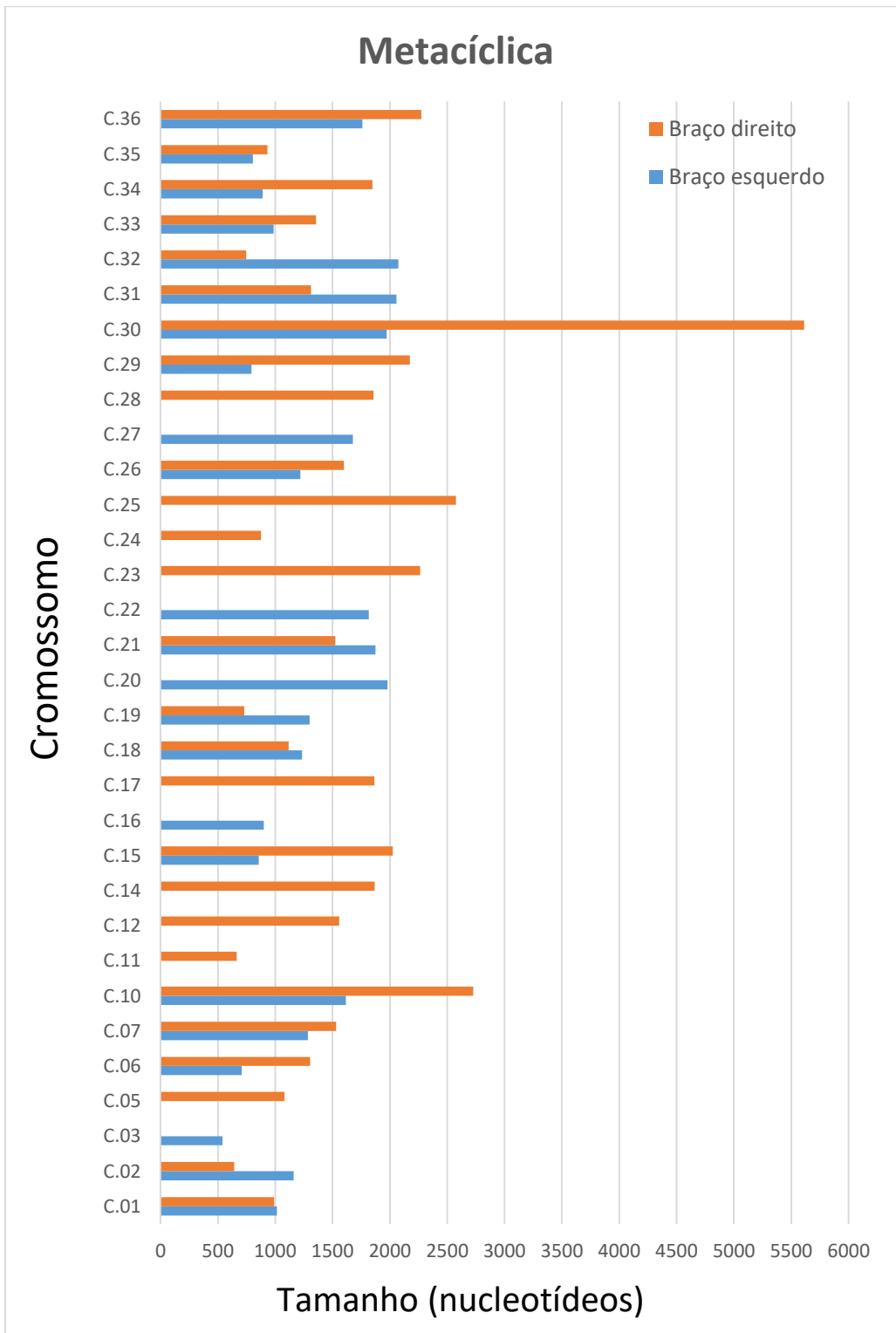


Figura 2.3. Tamanho dos transcritos TERRA em cada uma das extremidades com sinal SL, nas três formas de desenvolvimento do parasito: amastigota (A), promastigota (B), e metacíclica (C).

Para avaliar possíveis diferenças na expressão do TERRA entre as três formas de desenvolvimento de *L. major* foram identificados e normalizados os números de leituras calculando-se o RPKM com base nos dados das bibliotecas SL-Seq.

Como resultado desta análise foi gerado um diagrama Venn que mostra os padrões de expressão das extremidades dos 36 cromossomos que são específicos de cada forma e aqueles que são compartilhados entre as três formas de desenvolvimento do parasito (Fig. 2.4). Amastigotas e promastigotas possuem 48 extremidades com padrão de expressão único enquanto que as formas metacíclica possuem 44. As três formas de desenvolvimento compartilham 16 extremidades com o mesmo perfil de expressão, originadas do braço esquerdo dos cromossomos 4, 8, 9, 11, 12, 13, 24 e do braço direito dos cromossomos 3, 4, 8, 9, 13, 16, 20, 22, 27 (Fig. 2.4, anexo 2). Interessantemente nenhuma destas extremidades é transcrita (anexo 2). As formas amastigotas e promastigotas compartilham as extremidades do braço esquerdo dos cromossomos 6 e 35 (Fig. 2.4, Anexo 2), sendo que apenas a extremidade do cromossomo 35 é transcrita (anexo 2). As formas promastigota e metacíclica compartilham as extremidades do braço esquerdo dos cromossomos 5, 14, 17, 23, 25 e 28 (Fig. 2.4, anexo 2) sendo que nenhuma destas extremidades é transcrita (anexo 2). E finalmente, as formas amastigotas e metacíclica compartilham as extremidades do braço esquerdo dos cromossomos 21, 27 e as extremidades do braço direito dos cromossomos 15, 17, 23 e 3 (Fig. 2.4, anexo 2), sendo que, todas essas extremidades compartilhadas entre as duas formas são transcritas, sugerindo identidade no padrão de expressão entre amastigotas e metacíclicas, quando comparados amastigota com promastigota ou promastigota com metacíclica. A mesma semelhança no padrão de expressão de diferentes genes entre amastigota e metacíclicos foram observados durante o ciclo de desenvolvimento de *L. major* nos seus hospedeiros naturais (Inbar et al., 2017).

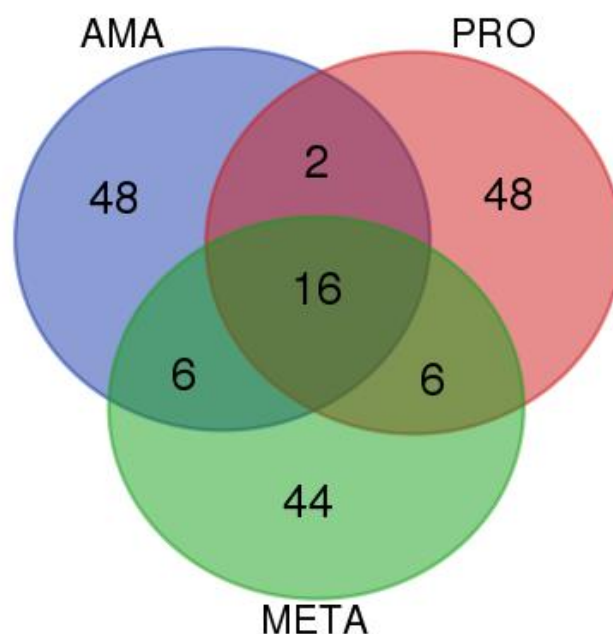


Figura 2.4. Diagrama de Venn mostrando a expressão comum e diferenciada dos transcritos nas extremidades cromossômicas dos 36 cromossomos de *L. major*. Comparação entre as formas amastigota (AMA), promastigota (PRO) e metacíclica (META).

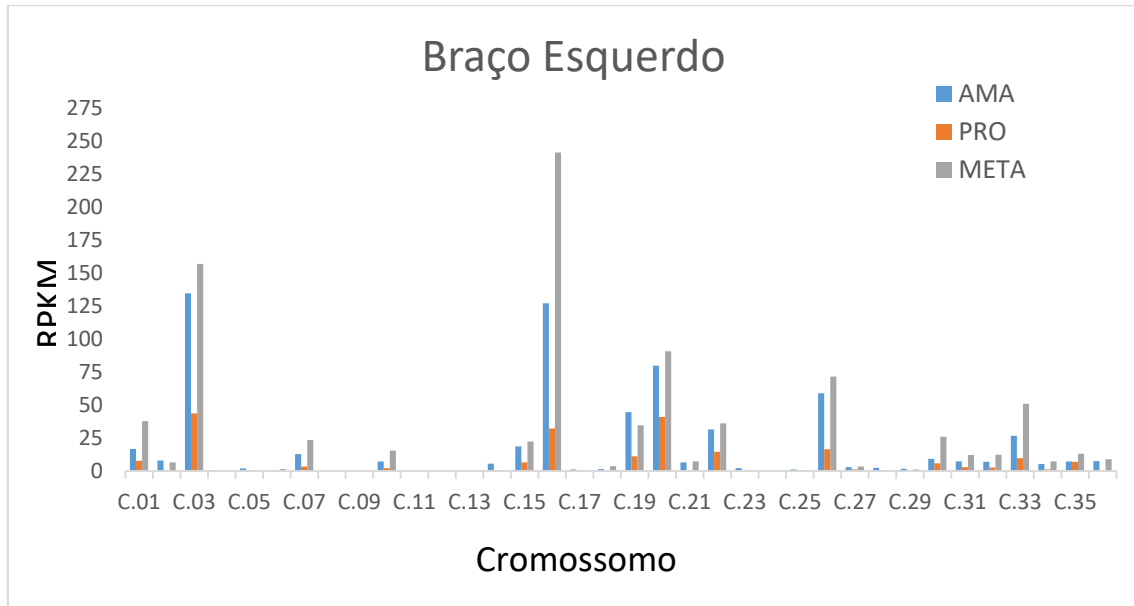
Para avaliar possível diferença de transcrição do TERRA entre cada uma das extremidades dos 36 cromossomos nas três formas de desenvolvimento da *L. major*, foram analisadas e comparadas as RPKM em cada uma das extremidades. Foi encontrado que das 29 extremidades dos braços esquerdos contendo sinal SL, 20 extremidades possuem mais transcritos na forma metacíclica, e 9 extremidades possuem mais transcritos na forma amastigota (Fig. 2.5A, anexo1). O mesmo padrão foi encontrado no braço direito. Das 27 extremidades com sinal SL, 22 extremidades possuem mais abundância de transcritos na forma metacíclica seguido por três extremidades com maior abundância de transcritos na forma amastigota e duas na forma promastigota (fig. 2.5B, anexo 1). Foi identificado também diferença do número de transcritos no mesmo cromossomo. Por exemplo, o cromossomo 20 tem sinal de transcrição no braço esquerdo (Fig.14A), mas não tem sinal de transcrição no braço direito (Fig. 2.5B). Diferenças no número de transcritos TERRA entre as extremidades do mesmo cromossomo também foram identificadas em humanos (ARORA; BRUN; AZZALIN, 2011; LÓPEZ DE SILANES et al., 2014; MONTERO et al., 2016; NERGADZE et al., 2009), sugerindo padrão de transcrição diferente entre as extremidades cromossômicas.

Estes resultados mostram claramente que o padrão de expressão do TERRA entre amastigotas e promastigotas é diferente comparado ao padrão de expressão do TERRA

entre amastigotas e metacíclicos. Os resultados de validação destes dados confirmam esta hipótese, como mostrado adiante.

Este é o primeiro trabalho que caracteriza independentemente a transcrição em cada uma das extremidades cromossômicas nas três formas de desenvolvimento de *L. major*. Isto só foi possível graças às bibliotecas SL-Seq que permitem análise acurada de transcritos processados por *trans*-splicing (CUYPERS et al., 2017), caso específico do tripanosomatídeos, incluindo *Leishmania* (AGAMI; SHAPIRA, 1992; BORST, 1986; LANDFEAR; WIRTH, 1985; MILLER; LANDFEAR; WIRTH, 1986).

A



B

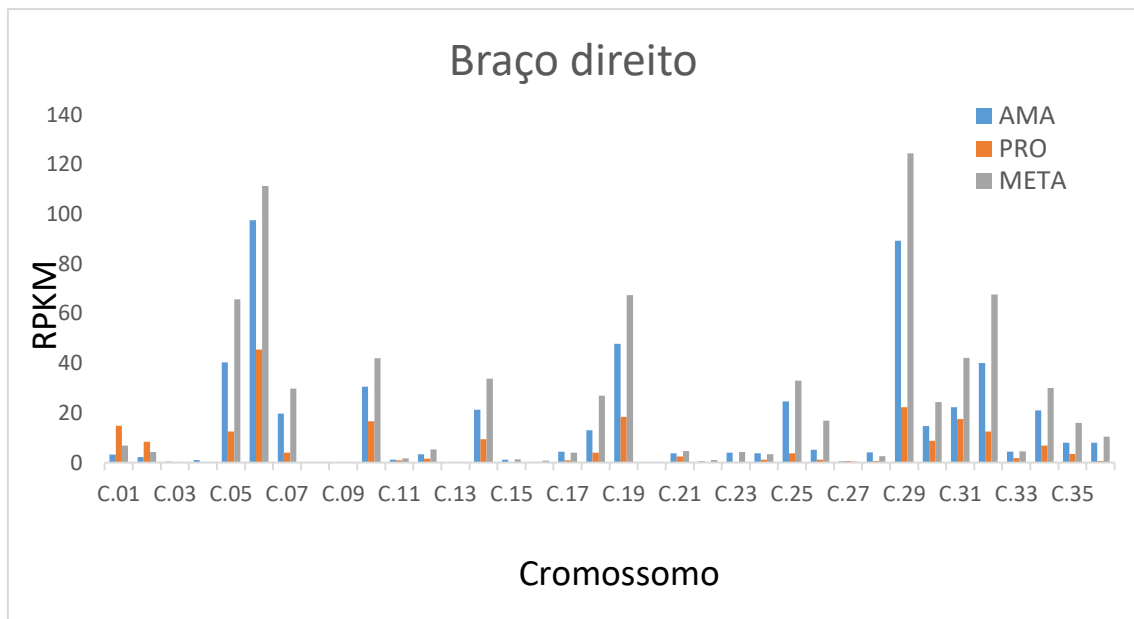


Figura 2.5. Transcritos (RPKM) de cada uma das extremidades do braço esquerdo (A) e braço direito (B), nas três formas de desenvolvimento da *Leishmania*: amastigota (ama), promastigota (pro) e metacíclica (Meta).

2.4.2. Classificação dos transcritos TERRA em *L. major* baseados nos dados das bibliotecas SL-Seq e ensaios de validação dos dados

Os achados *in silico* permitiram a classificação de 7 classes diferentes de extremidades cromossômicas de *L. major* baseados na presença ou ausência de elementos estruturais como as repetições subteloméricas CSB, o sinal SL e as ilhas

CpGs putativas como mostrado a seguir: Classe 1: Ausência de SL, CSB e ilha CpG; Classe 2: Presença de SL e ausência de CSB e CpG; Classe 3: Presença de SL e CpG e ausência de CSB; Classe 4: Presença de SL e CSB e ausência de CpG; Classe 5: Presença de SL, CSB e CpG; Classe 6: Presença de CSB e ausência de SL e CpG; Classe 7: Ausência de SL e presença de CSB e CpG, esta classificação foi realizada para as três formas de desenvolvimento do parasita: amastigota (Tabela 2.4), promastigota (Tabela 2.5) e metacíclica (Tabela 2.6) (Fig. 2.6). Vale ressaltar que a existência de sítios SL somente na fita telomérica rica em G nas extremidades cromossômicas de *L. major*, já sugere que há transcrição desta fita de DNA. A presença de ilhas CpGs putativas, sugere que provavelmente, a transcrição do TERRA pode ser regulada em nível transcricional como acontece em humano (NERGADZE et al., 2009), sendo que estas regiões são alvo de metilação. Aqui é necessário dizer que até o momento não há nenhum registro sobre metilação de DNA exercendo controle de transcrição em *Leishmania* e a identificação destas ilhas CpGs pode ser o primeiro passo para identificar controle epigenético da transcrição neste parasito.

Tabela 2.4. Análise *in silico* das extremidades dos 36 cromossomos de *L. major* na forma amastigota, baseados na presença (+) e ausência (-) de CSB, SL e CpG. Extremidades que são compartilhadas nas três fases de desenvolvimento em negrito.

AMASTIGOTA					
Tipo	Esquerdo	Direito	CSB	SL	CpG
1	9,12,13,24	3 ,4,22	-	-	-
2	1,2,3,5,7,15,16,21,29,35	2,11,17,18,24,31	-	+	-
3	27	1	-	+	+
4	14,17,18, 19,22,23, 26,28,30,33,34,36	6,7,15,21,23,25,26, 28,29,30,32,34,35	+	+	-
5	10,20,25,31,32	5,10,12,14,19,33,36	+	+	+
6	4,6,11,	9,13,16,20,27,	+	-	-
7	-	-	+	-	+

Tabela 2.5. Análise *in silico* das extremidades dos 36 cromossomos de *L. major* na forma promastigota, baseados na presença (+) e ausência (-) de CSB, SL e CpG. Extremidades que são compartilhadas nas três fases de desenvolvimento em negrito.

PROMASTIGOTA					
Tipo	Esquerdo	Direito	CSB	SL	CpG
1	2,5,9,12,13,21,24,29,	3,4,11,17,22,	-	-	-
2	1,3,7,15,16,35	2,18,24,31	-	+	-
3	27	1	-	+	+
4	19,22,26,30,33,34	6,7,21,25,26,29,30,32,34,35	+	+	-
5	10,20,31,32	5,10,12,14,19,33	+	+	+
6	4,6,11,14,17,18,23,28,36	9,13,15,16,20,23,27,28,	+	-	-
7	25	36	+	-	+

Tabela 2.6. Análise *in silico* das extremidades 36 cromossomos de *L. major* na forma metacíclica, baseados na presença (+) e ausência (-) de CSB, SL e CpG. Extremidades que são compartilhadas nas três fases de desenvolvimento em negrito.

METACÍCLICA					
Tipo	Esquerdo	Direito	CSB	SL	CpG
1	5,9,12,13,24,	3, 4, 22	-	-	-
2	1,2,3,7,15,16,21,29,35	2,11,17,18,24,31,	-	+	-
3	27	1	-	+	+
4	6,18,19,22,26,30,33,34,36	6,7,15,21,23,25,26,28,29,30,32,34,35	+	+	-
5	10,20,31,32	5,10,12,14,19,33,36	+	+	+
6	4,11,14,17,23,28,	9,13,16,20,27,	+	-	-
7	25	-	+	-	+

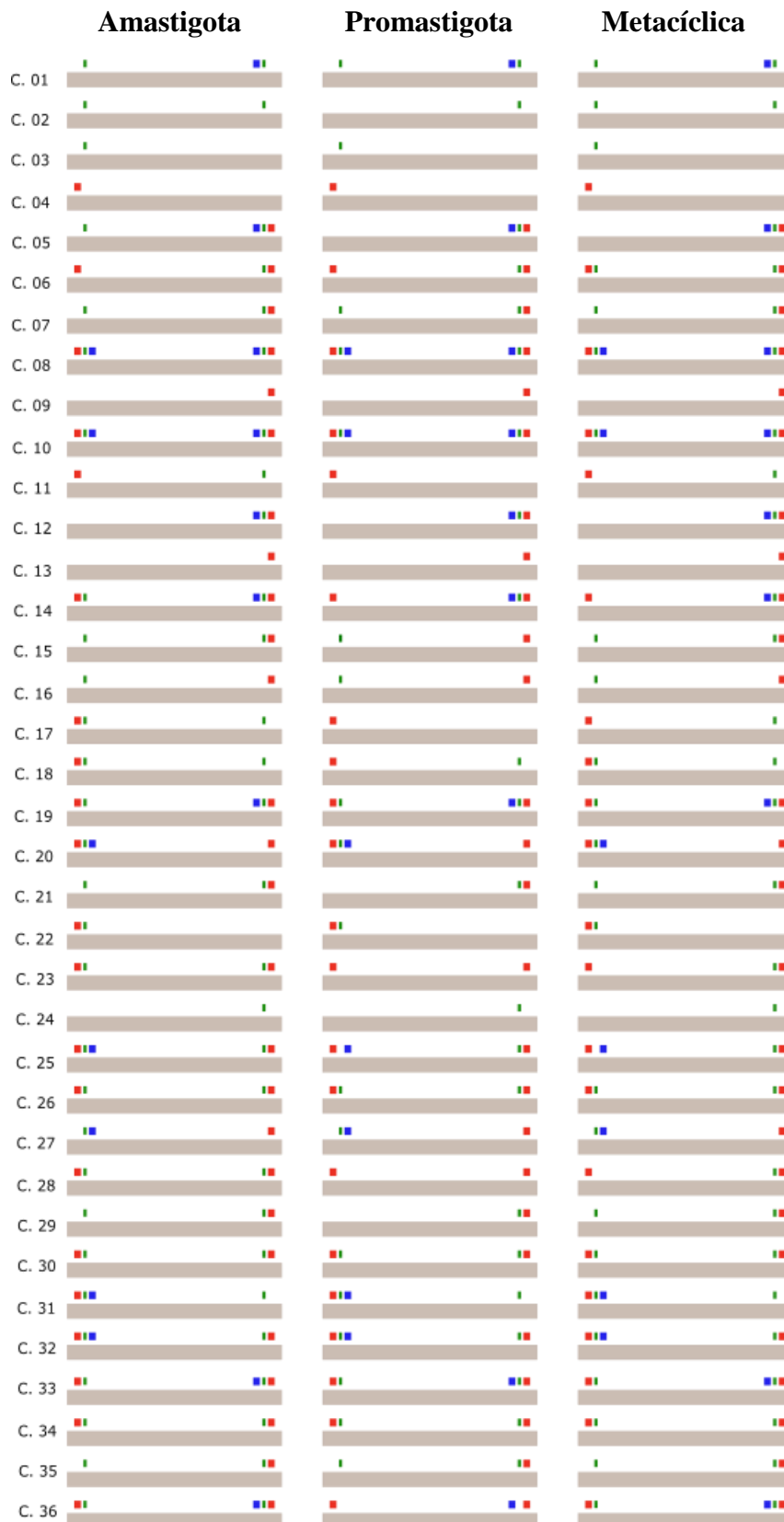


Figura 2.6. Análise *in silico* das extremidades dos 36 cromossomos de *L. major* na forma amastigota, promastigota e metacíclica baseados na presença (+) e ausência (-) de CSB (vermelho), SL (sequência líder) (verde) e ilhas CpG putativas (azul).

Para confirmar os resultados *in silico* que detectaram a presença de sinal transcricional nas extremidades cromossômicas da fita telomérica rica em G nas três formas de desenvolvimento de *L. major*, foram realizados ensaios de Northern blot a fim de detectar a presença e tamanho dos lncRNA TERRA (AZZALIN et al., 2007). Para este ensaio foi utilizado RNA total de *L. major* das formas amastigota, promastigota (passagem 1) e metacíclica (Fig.15).

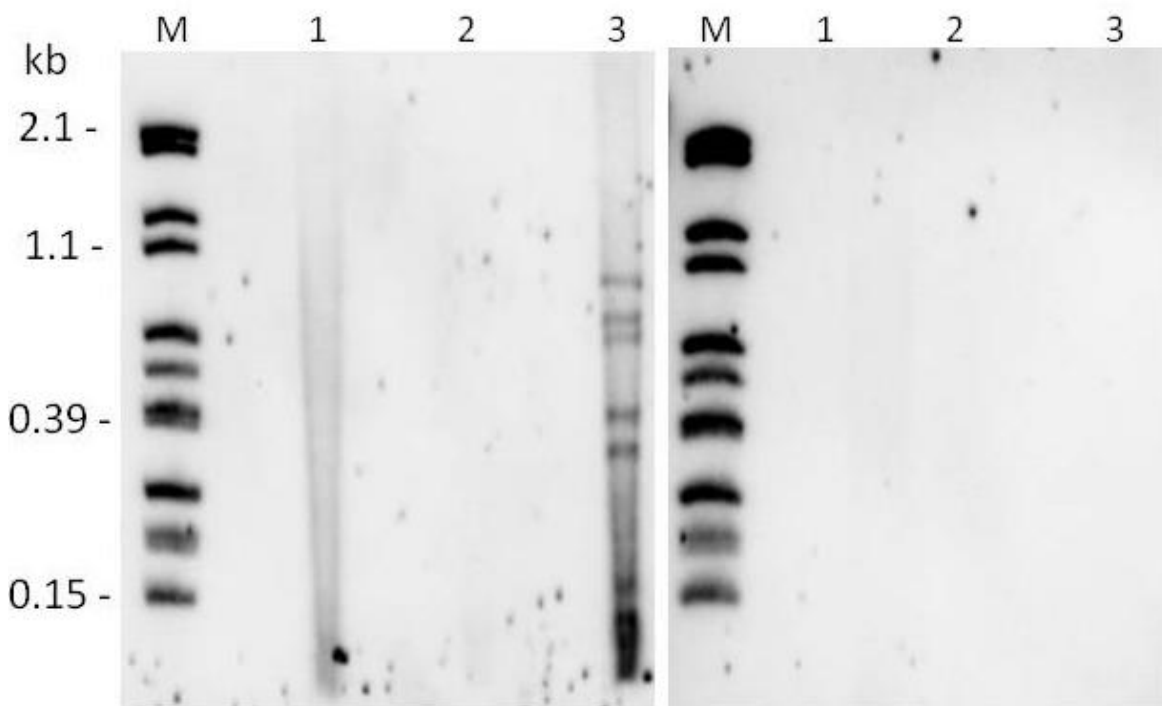


Figura 2.7. Transcritos TERRA detectados via Northern blot utilizando RNA total das formas amastigota, promastigota e metacíclica de *L. major*. (A) Northern blot utilizando a sonda DIG-Tel-C para identificar RNAs que são transcritos a partir da fita telomérica rica em G em amastigota (1) promastigota (2) e em metacíclica (3), onde (L) Marcador de peso molecular DIG-VI (Roche) (B) Os RNAs mostrados em A) foram tratados com RNase A.

Nos resultados mostrados na figura 16 pode-se observar sinal de hibridização em forma de mancha (arrastro característico de hibridização de repetições) sendo que na forma metacíclica a hibridização é mais intensa em algumas bandas indicando possivelmente a existência de transcritos mais abundantes (Fig. 2.7 linha 3). Na forma amastigota o sinal dos transcritos é menor (Fig. 2.7 linha 1) quando comparado à forma metacíclica e intrigantemente um sinal quase indetectável de hibridização aparece na forma promastigota (Fig. 2.7 linha 2). Estes resultados confirmam em parte as análises

das bibliotecas SL-Seq (Fig. 2.5), onde se verificou maior abundância do sinal de transcrição na forma metacíclica seguida da forma amastigota, embora não tenha sido detectado quase nenhum sinal de hibridização na forma promastigota. Este resultado sugere fortemente que pelo menos os RNAs identificados na forma amastigota e metacíclica são de fato correspondentes aos transcritos lncRNA TERRA, e que a mancha/arrasto representa os diferentes tamanhos desses transcritos, e correspondem ao tamanho previamente estimado dos fragmentos de restrição teloméricos descritos para *Leishmania* spp. (CONTE; CANO, 2005; FU; BARKER, 1998). Resultados idênticos foram demonstrados em outros eucariotos (AZZALIN et al., 2007; IGLESIAS et al., 2011; SCHOEFTNER; BLASCO, 2008). Como controle do Northern as amostras de RNA das três formas do parasito foram tratadas com RNase A (Fig. 2.7B).

Como no Northern blot mostrado na Figura 2.7 os RNAs haviam sido extraídos de formas promastigotas recém-transformadas a partir de formas amastigotas, o que se denomina de passagem 1 em cultura axênica. Por isso, outros ensaios de Northern blot foram realizados, foram utilizados RNAs extraídos de formas promastigotas que foram mantidos por tempo mais longo em cultura (passagem 3 e >6) (Fig. 2.8). Para nossa surpresa, foram detectados transcritos TERRA em ambos os RNAs obtidos das passagens 3 e >6, e verificou-se um aumento na quantidade destes transcritos a medida que se aumenta o número de duplicações celulares destes parasitos em cultura axênica (Fig. 2.8A). Estes resultados sugerem uma forte relação entre a transcrição do TERRA e o número de duplicações celulares destes parasitos.

Northern blots utilizando sonda telomérica rica em G (DIG-TEL-G) também foram realizados para verificar a existência de possíveis transcritos originados da fita telomérica rica em C nas formas promastigota e metacíclica. Como é possível observar, nenhum sinal de hibridização para a fita telomérica rica em C foi detectado em formas promastigotas e metacíclicas (Fig. 2.8B), sugerindo fortemente que em *L. major* a transcrição nos telômeros só é originada a partir da fita telomérica rica em G onde detectamos transcritos TERRA.

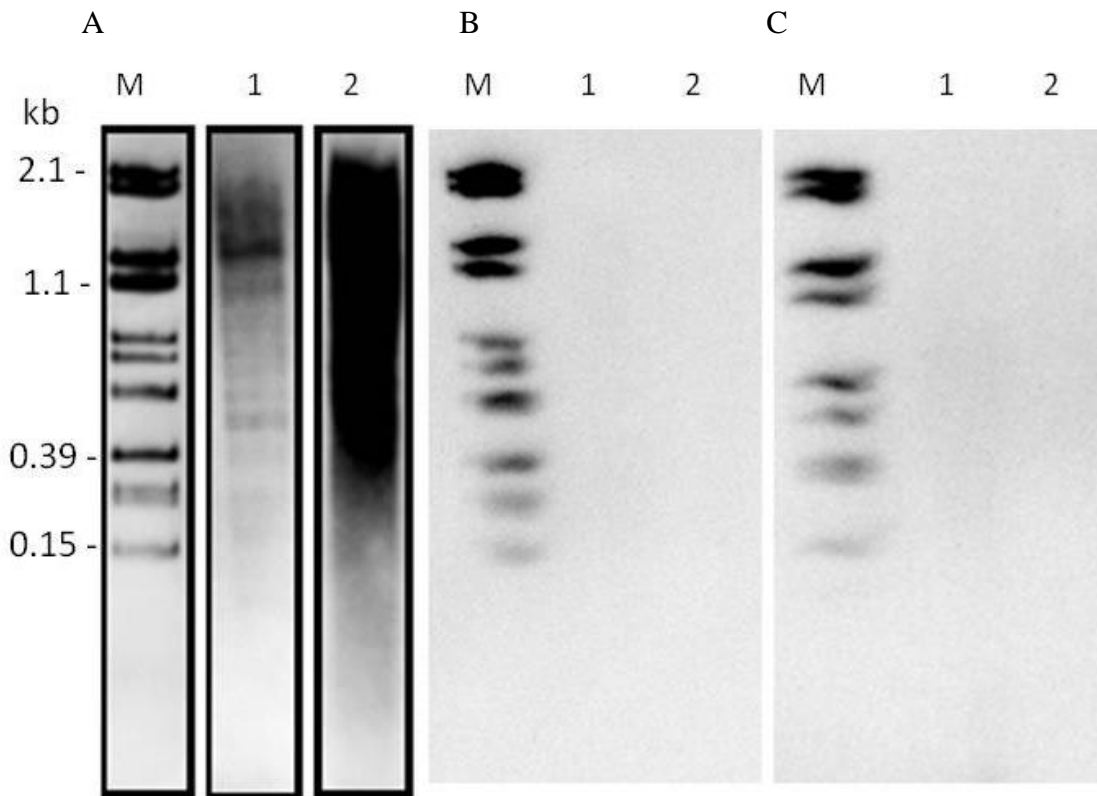


Figura 2.8. Transcritos TERRA são detectados em formas promastigota de *L. major* após várias duplicações celulares. (A) Northern blot utilizando a sonda DIG-TEL-C para identificar RNAs que são transcritos a partir da fita telomérica rica em G, em promastigotas passagem 3 (linha 2) e passagem >6 (linha 3). Marcador molecular DIG-VI (Roche) (1). (B) Northern blot utilizando a sonda DIG-TEL-G utilizada para identificar RNAs que poderiam ser transcritos a partir da fita telomérica rica em C em promastigotas (B) e em metacíclicos (C). (1) Marcador de peso molecular DIG-VI (2) RNA total tratado com DNase I e (3) RNA total tratado com DNase I e RNase A.

Juntando estes dados com as análises do SL-Seq sugere-se que na forma promastigota transcritos TERRA tornam-se mais abundantes à medida que promastigotas recém-transformados se adaptam ao meio de cultura axênico e se tornam promastigotas “adaptados” (nectomonada-like) (INBAR et al., 2017). Aí quando eles atingem a fase estacionária de crescimento e se transformam em metacíclicos (metaciclo genese) ocorre um aumento do número de transcritos TERRA como mostrado nas Fig. 2.5 e 2.8 . Dados semelhantes foram encontrados em estudos recentes sobre o transcriptoma de formas de desenvolvimento de *L. major* obtidas *in vivo* (naturalmente) no inseto vetor (*Phlebotomus duboscqi*) (INBAR et al., 2017). Os autores mostraram que ocorre uma extensa reprogramação genética durante os estágios iniciais de transformação de amastigotas em promastigotas. Estes promastigotas que em cultura são denominados de passagem 1, são altamente proliferativos e se dividem rapidamente no trato digestivo do inseto mostrando

muitas alterações na abundância de mRNAs que codificam proteínas de superfície e de metabolismo. Já na fase que eles denominam de promastigotas adaptados (equivalente a proastigotas de passagem >2), também denominados nectomonada, ocorre uma diminuição na expressão de genes envolvidos com ciclo celular, consistentes com um perfil de “arrest” e um aumento na expressão de genes relacionados a estresse e privação de nutrientes. Assim como mostrado neste trabalho, eles também mostraram que o transcriptoma dos promastigotas metacíclicos é mais semelhante ao das formas amastigotas, sugerindo uma pré-adaptação dos metacíclicos ao ambiente intracelular do hospedeiro mamífero. Mais ainda, eles observam uma enorme semelhança entre o transcriptoma das formas metacíclicas obtidas diretamente do inseto com aquelas obtidas a partir de culturas axênicas de formas promastigotas em fase estacionária, com a única diferença que as formas obtidas *in vivo* mostraram um forte aumento da expressão de transcritos associados com estresse nutricional.

Em adição aos ensaios acima mostrados também foi realizado RNA-FISH usando formas promastigota de *L. infantum*. O intuito deste ensaio foi o de identificar a localização subcelular de transcritos TERRA. Este ensaio foi realizado durante estágio BEPE no instituto de Medicina Molecular de Lisboa, sob orientação do Dr. Claus Azzalin. Os parasitos utilizados foram gentilmente cedidos pela Dra. Lenea Maria Campino (Instituto de medicina Tropical de Lisboa), e mantidas em cultura axênica no laboratório da Dra. Luisa Figueiredo. Como mostrado na Fig. 2.9, foi possível detectar sinal correspondente ao TERRA no núcleo dos parasitos, uma vez que estes não foram detectados quando os parasitos foram tratados com RNase A. Isto sugere fortemente que o sinal detectado corresponde ao transcrito TERRA. Chama a atenção a distribuição do sinal detectado em somente dois foci por célula, uma vez que em mamíferos, TERRA aparece distribuído em grande número de foci. Este é um resultado muito intrigante, uma vez que em promastigotas de *L. major* 38 extremidades cromossômicas apresentam o sinal de SL que sugere a transcrição do TERRA (Tabela 2.5, Fig.2.6). Este resultado sugere que é provável que a quantidade de transcritos TERRA seja diferente entre as espécies de *Leishmania* ou que em promastigota ela é mesmo dependente do número de duplicações celulares, uma vez que não tínhamos informação nenhuma sobre a amostra de *L. infantum* usada no experimento. Em breve pretendemos responder mais consistentemente essa pergunta, uma vez que o RNA-FISH para detecção do TERRA em *L. major* está em fase de padronização.

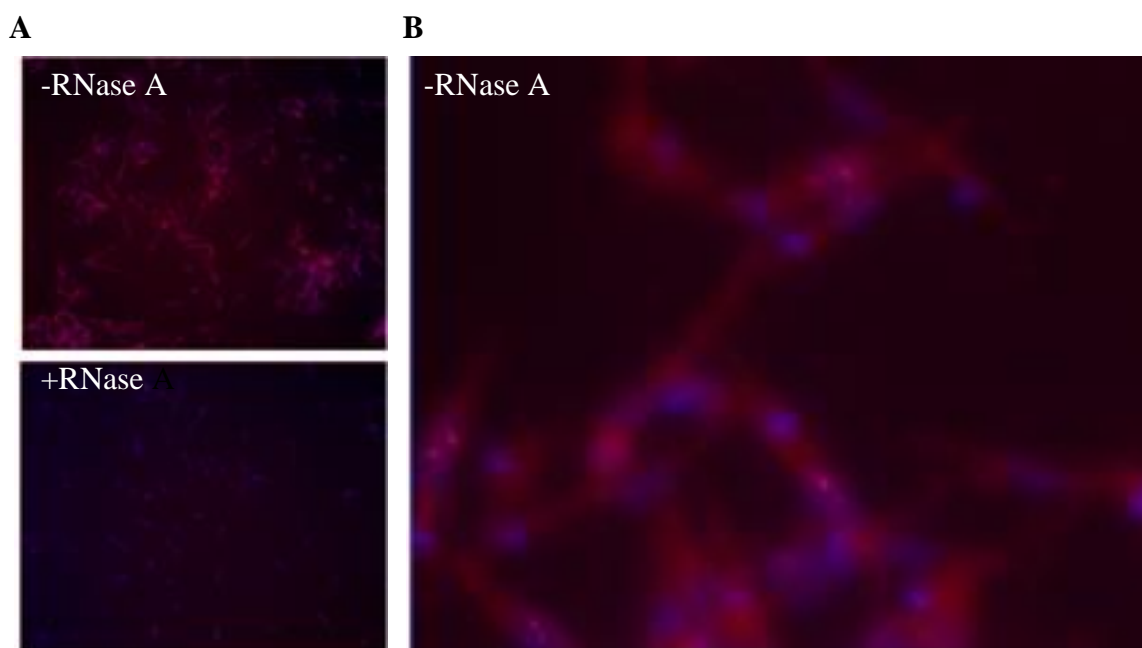


Figure 2.9. Localização subcelular do TERRA em formas promastigoras de *Leishmania infantum* usando RNA-FISH. A) Este ensaio foi realizado permeabilizando as células depois de serem fixadas com formalina 2%. Como controle os parasitos foram pre-tratados com RNase A. B) Zoon da imagem A mostrando os dois foci nucleares que apresentam o TERRA. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axiovert 200M, aumento de 63X, usando o programa ZEISS ZEN Microscope Software (blue edition).

2.4.3. Análise cromossomo-específico da transcrição do TERRA nas três formas de desenvolvimento de *L. major*

Com o objetivo de aprofundar os estudos sobre a expressão e a caracterização do TERRA, foram realizadas análises de expressão cromossomo-específico levando em consideração cada uma das características estruturais (7 classes diferentes de extremidades) que foram identificados nas extremidades dos 36 cromossomos (Tabela 2.4, 2.5 e 2.6). Devido ao fato que as extremidades cromossômicas compartilham sequências de nucleotídeos altamente similares entre os diferentes cromossomos, pois contém sequências características tais como CSB e regiões teloméricas (TTAGGG), isto dificultou a escolha dos cromossomos que iriam ter suas características avaliadas. Além disso, foram escolhidas extremidades cromossômicas com características semelhantes nas três formas de desenvolvimento de *L. major*. Assim, apenas 3 das 7 classes diferentes de extremidades do braço esquerdo (Classes 1, 2 e 5) e 5 das 7 classes para o braço direito (Classes 1, 2, 4, 5 e 6), de acordo com a Tabela 2.3, 2.4 e 2.5, foram analisadas (Tabela 2.7). Primeiramente as análises de expressão foram realizadas utilizando cDNA

sintetizado a partir de RNA total das formas amastigota promastigota (passagem-) e metacíclica de *L. major*, utilizando iniciadores específicos para a sequência telomérica (Tabela suplementar 1).

Tabela 2.7. Características estruturais presentes nas extremidades dos 36 cromossomos de *L. major* braço esquerdo e direito). Presença (+) ou ausência (-) de SL, CSB ou putativas ilhas CpG.

Tipo	Cromossomo		CSB	Biblioteca (A, P, M)	CpG
	Esquerdo	Direito			
1	9	3	-	-	-
2	3	24	-	+	-
4	-	29	+	+	-
5	20	10	+	+	+
6	-	9	+	-	-

Os resultados confirmam os dados obtidos nas análises das bibliotecas SL-Seq, em que apenas as extremidades que contém sinal SL localizados a montante das sequências subteloméricas são transcritas. Este é o caso das extremidades dos braços esquerdos dos cromossomos 3 e 20 e dos braços direitos dos cromossomos 10, 24 e 29, independentemente da presença de CSB e ilhas CpG, nas três formas de desenvolvimento de *L. major* (Fig. 2.10). Também não foram identificados transcritos a partir do braço esquerdo do cromossomo 9 e dos braços direitos dos cromossomos 3 e 9 (Fig. 2.10) os quais não apresentam sinal SL segundo as análises *in silico* (Fig. 2.5, anexo 1). O braço esquerdo do cromossomo 29 é um dos cromossomos que não apresenta sinal SL em promastigotas, porém em amastigotas e metacíclicos o número RPKM é baixo (1,793 e 1,275 RPKM respectivamente), o que pode indicar baixos níveis de expressão. O resultado do RT-PCR para esta extremidade cromossômica não detectou nenhum sinal de transcrição para nenhuma das formas do parasito (Fig. 2.10), sugerindo que o método utilizado não é muito eficiente para detectar baixos níveis de transcrição.

A figura 2.10 também demonstra que há diferença no padrão de expressão nas três formas de desenvolvimento do parasito, sugerindo uma possível regulação na expressão do lncRNA TERRA ao longo do ciclo de desenvolvimento de *L. major*, onde nos três cromossomos é clara a diminuição do acúmulo de transcritos nas formas metacíclicas,

assim como também existe diferença na abundância desses transcritos nas três formas do parasito. Resultados semelhantes foram demonstrados em outros eucariotos, onde a expressão de TERRA mostrou-se dependente da fase do ciclo celular, do estágio de desenvolvimento do tumor e também das extremidades cromossômicas analisadas (ARORA; BRUN; AZZALIN, 2011; LÓPEZ DE SILANES et al., 2014; MONTERO et al., 2016; NERGADZE et al., 2009), confirmando que a expressão do TERRA é um processo conservado entre os eucariotos e que segue determinados padrões.

Juntos os resultados de Northern blot e RT-PCR confirmam as análises *in silico* (Fig. 2.5, anexo 1), sugerindo fortemente que há transcrição a partir da região subteloamérica de alguns cromossomos e a existência de regulação da transcrição nos telômeros de *L. major*.

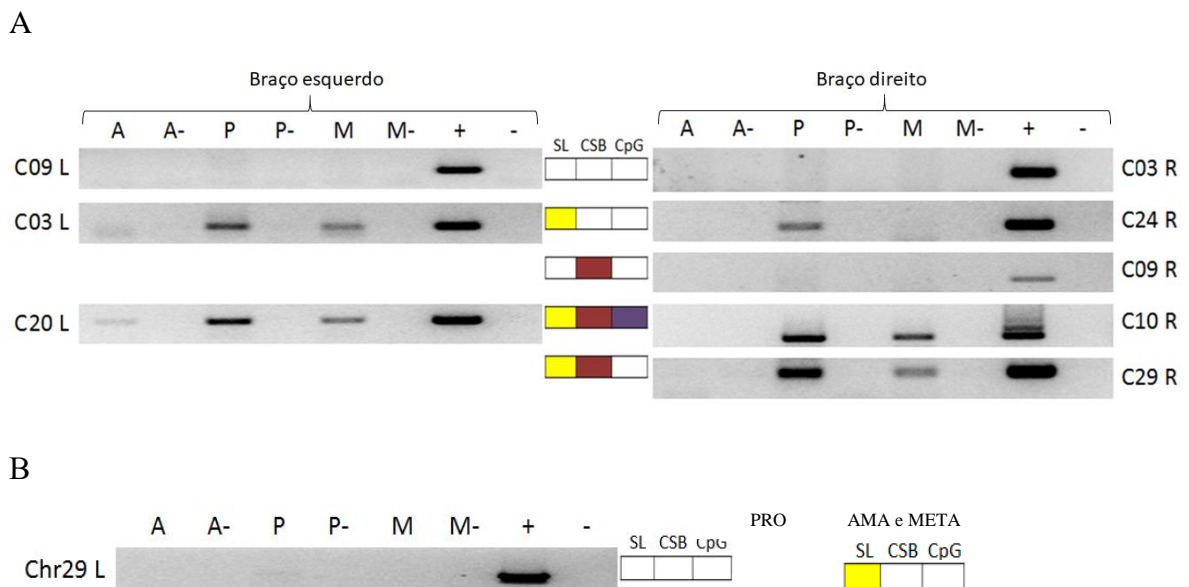
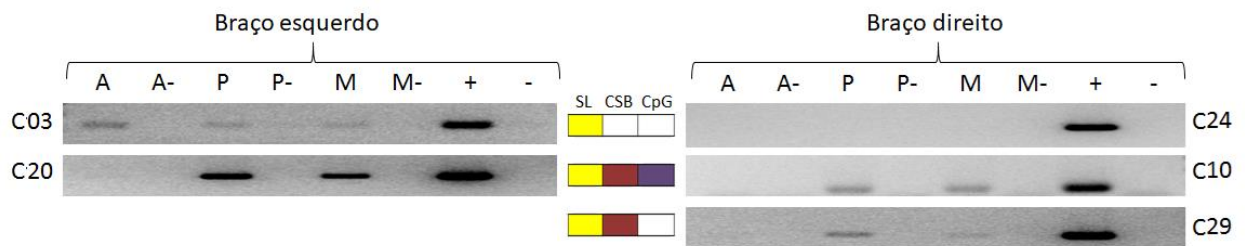


Figure 2.10. Detecção de transcritos da fita telomérica rica em G durante o ciclo de desenvolvimento de *L. major*. Ensaios RT-PCR foram realizados utilizando iniciadores que amplificam região subteloamérica e telomérica dos cromossomos 3 e 20 (braço esquerdo) e 24 10 e 29 (braço direito) nas três formas de desenvolvimento de *L. major* (A_ amastigota, P_ promastigota M_ metacíclica). Nenhum transcrito foi amplificado a partir das extremidades dos cromossomos 9 (Braço esquerdo) e dos cromossomos 3 e 9 (braço direito). (B) Nenhum transcrito TERRA foi amplificado a partir do cromossomo 29 (braço esquerdo) nas três formas de desenvolvimento *L. major*, amastigota (A), promastigota (P) e metacíclica (M) usando RT-PCR com iniciadores cromossomo-específico. Em A) e B) DNA genômico foi utilizado como controle positivo (+). Ensaios realizados na ausência de cDNA e de transcriptase reversa foram utilizados como controle negativo (-) para cada uma das formas de desenvolvimento do parasito (A-, P-,M-).

Para dar continuidade ao estudo dos lncRNAs foram verificadas as características dos transcritos maduros de TERRA em *L. major*. É sabido que em levedura de brotamento, todos os transcritos TERRA são poliadenilados e apenas uma fração dos transcritos TERRA em humanos e leveduras de fissão são poliadenilados (AZZALIN et al., 2007; BAH et al., 2012; LUKE et al., 2008; PORRO et al., 2010). Para identificar se os transcritos maduros TERRA em *L. major* são poliadenilados, foram realizadas análise de expressão utilizando olidodT para síntese da primeira fita de cDNA. As análises de RT-PCR foram realizadas a partir dos cromossomos que apresentaram transcrição do TERRA utilizando iniciadores teloméricos para a síntese da primeira fita de cDNA como demonstrado anteriormente (Fig. 2.10). Os resultados demonstram que a maioria dos transcritos TERRA originados dos cromossomos selecionados são poliadenilados. Transcritos polyA+ se originam a partir dos cromossomos 03 e 20 (braço esquerdo) e 10 e 29 (braço direito). Não foram identificados transcritos polyA+ a partir do cromossomo 24 (braço direito) (Fig. 2.11A). Estas análises são confirmadas também por RT-qPCR (Fig. 2.11B), a qual é uma metodologia mais sensível. Possivelmente os transcritos poliadenilados são gerados pelo processamento da RNA polimerase II, assim como descrito em leveduras de brotamento e humanos (BAH et al., 2012; LUKE et al., 2008; NERGADZE et al., 2009; PORRO et al., 2010; SCHOEFTNER; BLASCO, 2008). O fato de não ter amplificação do transcrito do braço direito do cromossomo 24 indica que em *Leishmania* existem os dois tipos de transcritos TERRA, poliadenilados e não poliadenilados como demonstrado em outros eucariotos (BAH et al., 2012; PORRO et al., 2010). No caso da *L. major*, a presença da cauda poliA somado ao sinal SL indicam que os transcritos TERRA podem ser processados por *trans*-splicing (LANDFEAR; WIRTH, 1985; MILLER; LANDFEAR; WIRTH, 1986).

A



B

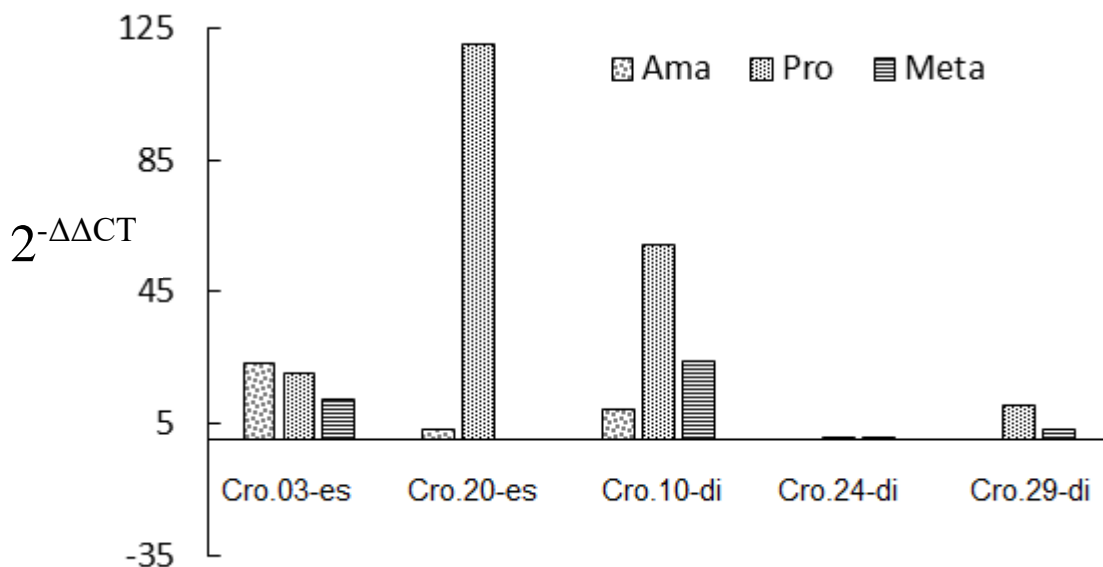


Figure 2.11. A maioria dos transcritos TERRA são poliadenilados nas três formas de desenvolvimento *L. major*. cDNA obtido a partir de RNA polyA+ de amastigota (A), promastigota (P) e metacíclica (M) foram amplificados via RT-PCR usando oligodT e iniciadores cromossomo específicos. Como controle da reação foram realizadas reações sem transcriptase reversa (A-, P-, M-), com DNA genômico (+) como controle positivo, ou sem cDNA usado como controle negativo (-). (B) **Expressão quantitativa** das extremidades cromossômicas dos cromossomos 3 e 20 (braço esquerdo) e cromossomos 10, 24 e 29 (braço direito) a partir de RNA polyA+ usando qRT-PCR (power up Syber Green PCR mix, applied byosistemas) nas três formas de desenvolvimento de *L. major* (Ama-amastigota Pro-promastigota e Meta-Metacíclica). Como gene normalizador foi selecionado o gene RPA que codifica a proteína telomérica RPA-1.

Análise de expressão por RT-qPCR foram realizadas com apenas uma amostra biológica. O próximo passo será a repetição com pelo menos mais duas amostras biológicas, a fim de confirmar os resultados obtidos até o momento.

Para verificar se o aumento detectado de transcritos TERRA em parasitos que sofreram varias duplicações celulares tem alguma implicação na maquinaria telomérica, foi realizado um Southern blot telomérico. Este ensaio permite detectar alterações no

tamanho dos fragmentos de restrição telomérica. Para sua realização utilizamos DNA genômico de parasitos obtidos a partir do mesmo ciclo de desenvolvimento (amastigotas, promastigotas passagem 1 e metacíclicos derivados desses promastigotas) e promastigotas e metacíclicos de passagem 2 a 6, resultantes de repiques contínuos em cultura axênica dos promastigotas de passagem 1. Os resultados apresentados na Fig. 2.12 mostram que na forma amastigota os telômeros são mais curtos que os telômeros dos promastigotas recém-formados em cultura a partir deles (promastigotas de passagem 1). Estes por sua vez, apresentam telômeros mais longos também que os metacíclicos deles derivados (Fig. 2.12). O que se vê na sequência é que promastigotas e metacíclicos de passagem 2 a 6 apresentam progressivo encurtamento dos telômeros e que o padrão observado na passagem 1 para os telômeros de formas metacíclicas se mantém. Ou seja, nestas formas, com exceção da passagem 6, os telômeros são mais curtos que os de promastigotas. Fenômeno idêntico foi verificado por nosso grupo em relação ao telômero de *L. amazonensis* (Roveri & Cano et al., em preparação). Também é possível observar que na passagem 6 o tamanho dos telômeros das formas promastigota e metacíclicas é bastante semelhante (Fig. 2.12).

Analisando estes resultados juntamente com a expressão de TERRA nas diferentes formas do parasito, concluímos que nos parasitos que apresentam encurtamento progressivo dos telômeros se detecta aumento dos níveis de transcritos TERRA. Isto sugere que i) há regulação da expressão de TERRA em nível transcricional nos telômeros durante o desenvolvimento de *L. major*, ii) o TERRA pode estar diretamente envolvido com a manutenção dos telômeros nesses parasitos, talvez regulando negativamente a atividade de telomerase e que iii) provavelmente as formas promastigotas e metacíclicas delas derivadas entram em senescência replicativa após vários ciclos de duplicação *in vitro*, uma vez que apresentam encurtamento progressivo dos telômeros. O TERRA tem papel versátil e essencial na regulação do comprimento telomérico em diferentes eucariotos tanto em células telomerase positiva quanto em células telomerase negativa (ALT) (ARORA et al., 2014; ARORA; AZZALIN, 2015; BALK et al., 2013; PFEIFFER et al., 2013; YU; KAO; LIN, 2014). Também é conhecido que os níveis e a localização do TERRA é regulada dependendo da fase do ciclo celular (AZZALIN; LINGNER, 2015; FLYNN et al., 2015; PORRO et al., 2010), o que confere com os resultados de expressão aqui apresentados para as diferentes fases de desenvolvimento de *L. major*. Porém ainda não está esclarecido como o TERRA é regulado. Mostramos aqui que níveis de transcritos TERRA aumentam da passagem 3 para a passagem >6 nas formas promastigota (Fig.

2.8A), as quais apresentam encurtamento gradual dos telômero (Fig. 2.12), enquanto em promastigota passagem 1 os telômero são longos (Fig. 2.12) e não se detecta transcritos TERRA (Fig.2.7). Em outros organismos já foi mostrado que telômero curtos acumulam altos níveis de TERRA (GRAF et al., 2017; MAICHER et al., 2012; MORAVEC et al., 2016) e que o inverso, ou seja, telômero longos, apresentam um número limitado de transcritos TERRA (GRAF et al., 2017; MORAVEC et al., 2016). O aumento de transcritos TERRA tem consequências fisiológicas especialmente na taxa de senescência celular, pois a superepressão do TERRA em um único telômero é suficiente para induzir senescência prematura (MAICHER et al., 2012). Além disso, quando os telômeros encurtam durante a senescencia replicativa a abundancia de TERRA aumentacuse (CUSANELLI; ROMERO; CHARTRAND, 2013; MORAVEC et al., 2016), o que vai de encontro com os resultados aqui mostrados. Embora, o processo de senescencia ainda não tenha sido descrito em *Leishmania*, os resultados aqui apresentados sugerem fortemente que além deste fenômeno estar presente na vida dos parasitos, ele também têm ação direta dos lncRNA TERRA, podendo futuramente ser utilizada como ferramenta para erradicar os parasitos.

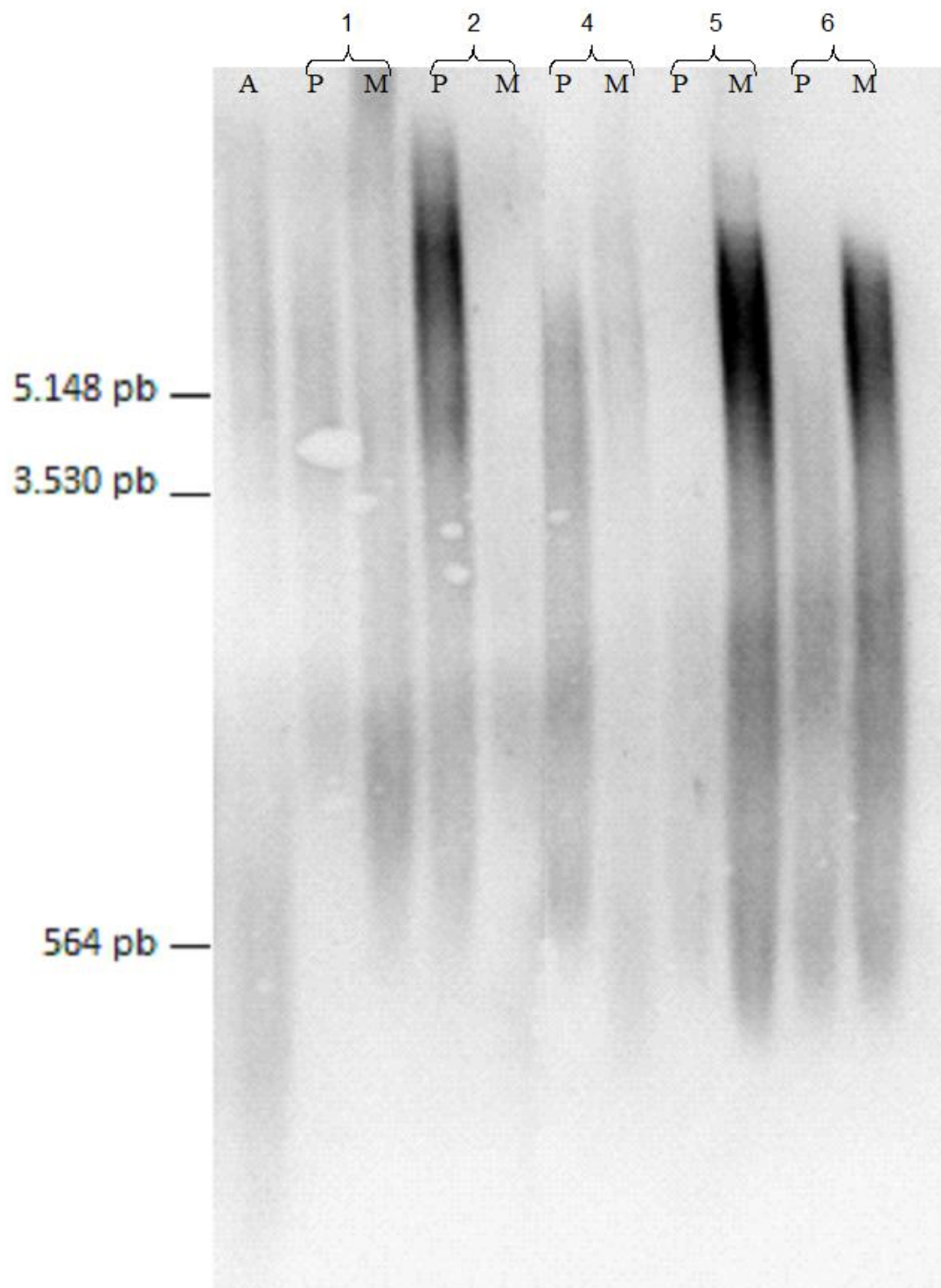


Figura 2.12. Perfil de restrição telomérica nas diferentes formas de desenvolvimento de *L. major* e em parasitas que acumularam várias duplicações celulares. Amastigota (A), Promastigote (P passagem 1, 2, 4, 5, e 6) e Metacíclica (M passagem 1, 2, 4, 5, e 6). Neste ensaio foi utilizado 1 µg de DNA genômico de cada amostra, digerido com *Rsa* I. O southern blot foi hibridizado com a sonda DIG-TELC e revelado por quimioluminescência.

2.5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, tanto *in silico* como experimentalmente, conclui-se que há transcritos TERRA nas três formas de desenvolvimento de *L. major* e que os níveis de expressão destes transcritos são fase dependente. Além disso, mostramos que é muito provável que o TERRA esteja envolvido na regulação da manutenção dos telômeros do parasito, uma vez que aqueles indivíduos que acumulam muitas replicações celulares, apresentam níveis elevados de TERRA e apresentam diminuição gradual do tamanho dos telômeros. Adicionalmente também confirmamos que pelo menos em relação à biologia telomérica, as formas metacíclicas são similares às formas amastigotas, fato que pode ser devido à pre-adaptação da maquinaria dos metacíclicos no hospedeiro invertebrado, às mudanças necessárias para sobrevivência em seu próximo hospedeiro (hospedeiro mamífero). Finalmente, nossos resultados sugerem um possível processo de senescência replicativa em *Leishmania*, o qual provavelmente é regulado pelo TERRA. O processo de senescência nunca foi elucidado para *Leishmania*, o que abre novas possibilidades para se desvendar este mecanismo que futuramente poderá ser utilizado como ferramenta para erradicar os parasitos.

CAPÍTULO 2

3. CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO DA ILHA CPG PUTATIVA LOCALIZADA NA REGIÃO SUBTELOMÉRICA DO CROMOSSOMO 10 EM *L. major*

3.1. INTRODUÇÃO

Os telômeros são estruturas nucleoprotéicas que estão presentes na maioria das células de eucariotas e são responsáveis por proteger os cromossomos da degradação, recombinação e translocação, assegurando que a informação genética seja corretamente copiada durante a divisão celular, além de ajudar na regulação do comprimento do DNA telomérico e serem essenciais para a finalização da duplicação do DNA durante o ciclo celular, estando associados a diversos processos importantes, tais como; controle da divisão celular, envelhecimento, regulação da transcrição, integridade do genoma e manutenção da arquitetura nuclear (CHAN; BLACKBURN, 2004; DMITRIEV; PETROV; DONTSOVA, 2003; GIARDINI et al., 2014). Além disso, dez anos atrás foi descoberto que longos RNAs não codificantes são transcritos a partir dos telômeros (AZZALIN et al., 2007) e denominados como transcriptoma telomérico.

O longo RNA não codificante mais estudado até o momento é o TERRA, o qual está envolvido na regulação do comprimento e replicação do telômero, resposta a danos no DNA telomérico, mudanças na composição da cromatina telomérica, integridade do telômero e é essencial para a manutenção dos telômeros (AZZALIN; LINGNER, 2015; CHU et al., 2017; MONTERO et al., 2016). Em humanos, o promotor do TERRA é composto por ilhas CpGs que contém repetições em *tandem* de 37 a 39 pares de bases precedidas de repetições em *tandem* de 61 pares de bases (NERGADZE et al., 2009). Estas ilhas CpGs são metiladas por enzimas de metilação de DNA (DNMT), responsáveis pela adição do radical metil ao carbono 5 da citosina (m⁵C), a fim de regular sua atividade transcricional (FARNUNG; GIULOTTO; AZZALIN, 2010; NERGADZE et al., 2009).

Em *Leishmania* spp., existem apenas dois trabalhos publicados que caracterizaram ilhas CpGs. GUPTA et al., (2015) e DAS et al., (2015), utilizando sequências consenso de ilhas CpGs humanas, que reconhecidamente interagem com receptores do tipo Toll-like receptor 9 (TLR9), encontraram ilhas CpGs de padrão semelhante no genoma de *L. donovani*, as quais são capazes de interagir especificamente com estes receptores na célula hospedeira. Embora tenham sido identificadas ilhas CpGs em *Leishmania* spp., a classificação ou padrão de repetições C e G destas ilhas CpGs é diferente à classificação

das ilhas CpGs encontradas no promotor do TERRA. Desta forma um dos objetivos deste trabalho é identificar e caracterizar ilhas CpG envolvidas na regulação do TERRA em *Leishmania major*.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo geral

- Caracterizar a função das ilhas CpGs putativas nas regiões subteloméricas em *L. major*.

3.2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a função regulatória das ilhas CpGs putativas
- Detectar a metilação nas ilhas CpGs putativas

3.3. METODOLOGIA

3.3.1. Clonagem e sequenciamento do transcrito de TERRA e ilha CpG putativa da extremidade do braço direito do cromossomo 10

Foi realizada amplificação via PCR do transcrito TERRA (a partir de cDNA obtido com iniciadores específicos para a sequência telomérica) e ilha CpG putativa (DNA genômico) presente na extremidade do braço direito do cromossomo 10. Foi utilizada *Platinum®Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) para amplificação do fragmento correspondente e iniciadores específicos Ilha_CpG10d (Tabela suplementar 1). Os iniciadores utilizados para amplificação da ilha CpG putativa contém sítios para a enzima de restrição Sal I.

Os produtos amplificados foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1%. O gel foi corado com brometo de etídeo 0,1µg/ml e visualizado através de um transluminador com luz ultravioleta. Cada *amplicom* foi clonado no vetor de clonagem PCR 4-TOPO (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. Foram utilizadas células competentes da cepa DH5α de *Escherichia coli* para transformação via electroporação. Após, as bactérias foram plaqueadas em placa de Pertri contendo meio LB (Luria-Bertani) sólido contendo antibiótico ampicilina 50µg/ml. As colônias foram selecionadas através de PCR utilizando os iniciadores M13 (Tabela suplementar 1). Posteriormente, foi feita a minipreparação para extração do DNA plasmidial de algumas colônias contendo o fragmento esperado, utilizando o kit comercial *PureLink® 96 HQ Mini Plasmid DNA Purification Kit* (Invitrogen) seguindo o manual do fabricante. Após a minipreparação, foi realizada outra PCR para confirmação da clonagem do fragmento e, posteriormente, os clones foram enviados para sequenciamento Sanger. As sequências foram avaliadas utilizando o *software* CLC Sequence Viewer 7.6 e submetidas à pesquisa junto ao banco de dados do NCBI, website (“BLAST: Basic Local Alignment Search Tool”, [s.d.]) utilizando a ferramenta BLAST.

3.3.2. Análise de detecção de metilação nas ilhas CpGs putativas localizadas em região subtelomérica

Esta é uma metodologia que consiste em detectar sítios de metilação no DNA pelo uso de enzimas de restrição que são bloqueadas por metilação, seguida de reação de PCR. A PCR foi realizada com iniciadores que flaqueiam o sítio de restrição da sequência

em questão (Tabela suplementar 1). Foram utilizadas as enzimas *AvaI*, *MluI* e *NheI* (New England Biolabs) as quais são especificamente bloqueadas por metilação em resíduos de Citosina (“Home - NEB | New England Biolabs”, [s.d.]). A sequência da ilha CpG da extremidade do braço direito do cromossomo 10 possui sítio para *AvaI* e *NheI*. Como controle negativo do ensaio foi utilizada a sequência que codifica o gene da alfa-tubulina (GenBank acc# AL359777) a qual não tem sítio de restrição para nenhuma das enzimas utilizadas e como controle positivo foi utilizada a sequência do gene RPA-1 que codifica uma proteína envolvida na maquinaria telomérica do parasito (NETO et al., 2007) o qual tem sítios de restrição para *AvaI* e *MluI*.

Foi realizada conversão das bases citosinas em uracilas por tratamento com bissulfito de sódio (kit comercial EZ DNA Methylation Gold Kit -Zymo Research - seguindo a recomendação do fabricante), após extração de DNA genômico. Posteriormente, a região contendo 857 pb correspondente à ilha CpG 61 putativa do cromossomo 10, foi amplificada via reação *semi-nested* PCR com iniciadores específicos, desenhados a partir do DNA convertido (Tabela suplementar 1), as bandas correspondentes ao fragmento foram retiradas do gel de agarose, purificadas e clonadas em vetor de clonagem TOPO TA[®] (Invitrogen). Plasmídeos resultantes desta clonagem foram utilizados para transformar *E. coli* TOP 10. Pelo menos 10 colônias obtidas a partir da clonagem da região correspondente à ilha CpG 61 putativa do cromossomo 10 de cada forma de desenvolvimento (promastigota, metacíclica e amastigota) foram sequenciadas (Sanger) e comparadas com a sequência obtida a partir da busca *in silico* das ilhas CpGs putativas em *L. major*.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo fato do cromossomo 10 ser o único cromossomo de *L. major* que apresenta características estruturais comuns nas três formas de desenvolvimento de *L. major* (Tabela 2.4, 2.5 e 2.6), e, possui as mesmas características estruturais das extremidades cromossômicas que transcrevem o TERRA em humanos (Fig. 3.1), foi selecionado o transcrito amplificado por RT-PCR para sequenciamento com o intuito de confirmar que a região amplificada pertence à extremidade do braço direito do cromossomo 10. Os resultados do sequenciamento confirmam que o transcrito é originado da extremidade direita do cromossomo 10 como esperado (Fig. 3.2, anexo 3).

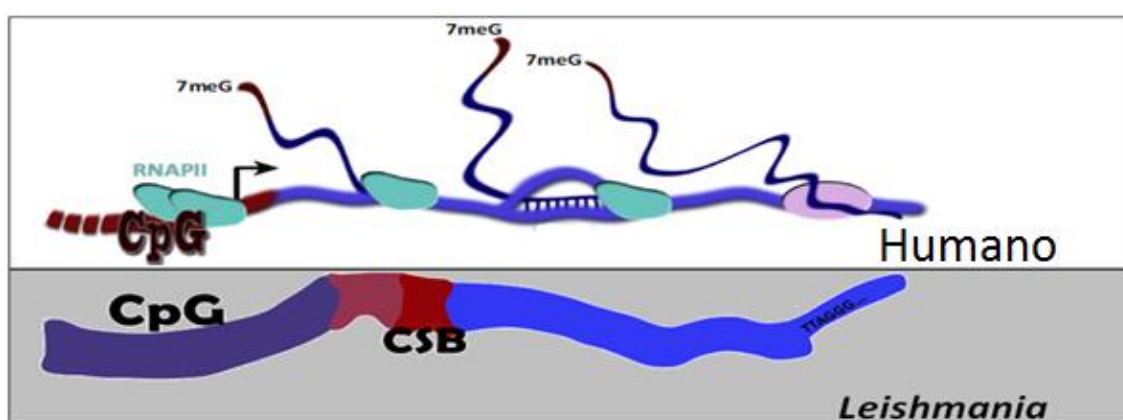
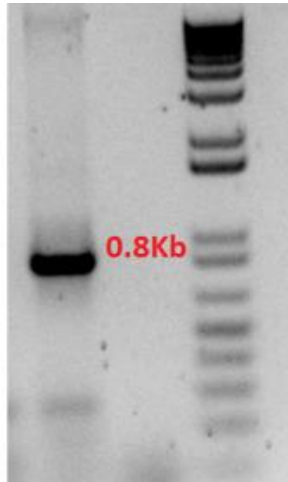


Figura 3.1. Comparação entre as regiões subteloômicas de cromossomos humanos e do cromossomo 10 de *L. major*. Quadro superior: Em humanos, transcritos TERRA maduros podem ser poliadenilados ou não, porém todos possuem o *cap* modificado pela adição de 7-metil-Guanosina e interagem com componentes da cromatina telomérica (representado pelo círculo rosa). Sua expressão é controlada pela metilação das ilhas CpGs localizadas a montante da região subteloômica onde se inicia a transcrição. Quadro inferior: Nas duas extremidades do cromossomo 10 de *L. major*, as ilhas CpGs putativas (púrpura) também se encontram a montante dos elementos subteloômicos CSBs (vermelho) e do sítio de início de transcrição pelo sinal SL (rosa) e da repetição telomérica (cor azul).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
544 bits(294)	7e-151	294/294(100%)	0/294(0%)	Plus/Plus
Query 1	CACACCGTGAACGCAAGGAAACGCATTGCAGCTCTGCTACGCTCTTTGTTGAGCGGAAGC			60
Sbjct 569352	CACACCGTGAACGCAAGGAAACGCATTGCAGCTCTGCTACGCTCTTTGTTGAGCGGAAGC			569411
Query 61	CTTCGCAGAACGCACCACCGGAAGTGAGTGTGAGGGGAAACGGCGAATTTCCGCTAA			120
Sbjct 569412	CTTCGCAGAACGCACCACCGGAAGTGAGTGTGAGGGGAAACGGCGAATTTCCGCTAA			569471
Query 121	CGTTTTTATCCACGGGTACGGGTGAGGGTACGGATGTACTCTCAGGGTCAGGGTTAGGG			180
Sbjct 569472	CGTTTTTATCCACGGGTACGGGTGAGGGTACGGATGTACTCTCAGGGTCAGGGTTAGGG			569531
Query 181	TTTTGCTCTCCACTGATTCCTTGACACAGCGACACCCTCTCAGCTGGACGGGTGCGTGAC			240
Sbjct 569532	TTTTGCTCTCCACTGATTCCTTGACACAGCGACACCCTCTCAGCTGGACGGGTGCGTGAC			569591
Query 241	GGTGTAATACTGTACTGGGTGACGGGTGTGCTACTGTACTGGTTAGGGTTAGGG			294
Sbjct 569592	GGTGTAATACTGTACTGGGTGACGGGTGTGCTACTGTACTGGTTAGGGTTAGGG			569645

Figura 3.2. Blast do sequenciamento do TERRA transcrito a partir do braço direito do cromossomo 10. cDNA obtido a partir de promastigotas de *L. major*, amplificado a partir da região subteloamérica do cromossomo 10 e clonado no vetor PCR 4-TOPO (Fig. 2.10).

Com o objetivo de caracterizar o papel das ilhas CpGs putativas localizadas nas extremidades dos cromossomos (Tabela 2.2) e verificar se as mesmas estão sujeitas à metilação do tipo m⁵C e subsequentemente vislumbrar uma possível atuação dessa região como promotor do lncRNA TERRA, selecionamos inicialmente a extremidade do braço direito do cromossomo 10, já que o mesmo é estruturalmente similar às extremidades cromossômicas de humano (Fig. 3.1). Inicialmente a ilha CpG putativa foi amplificada por PCR, clonada em vetor de clonagem pCR4-TOPO (Fig. 3.3, anexo4) e submetida a sequenciamento Sanger para confirmação da correta amplificação do fragmento. A posterior confirmação do papel de promotor, semelhantes às ilhas CpGs subteloéricas em humanos, será realizada utilizando-se esta sequência como possível promotor do gene que codifica a GFP (*Green fluorescence protein*) em vetor de expressão em *Leishmania* spp. (ex pXGFP, (GUEVARA et al., 2001)). Para tanto a sequência putativa da ilha CpG subteloérica do cromossomo 10 será subclonada substituindo o promotor T7, que controla a transcrição do gene repórter GFP no plasmídeo pXGFP. Com esta metodologia confirmaremos se a ilha CpG putativa atua de fato como promotor.

A**B**

Leishmania major strain Friedlin complete genome, chromosome 10
Sequence ID: [FH796406.1](#) Length: 570865 Number of Matches: 2

Score	Expect	Identifiers	Query	Strand
1552 bits(840)	0.0	B40(840)(100%)	Q(840)(0%)	Plus/Minus
Query 1	TTACAGCTCCGACCTTCCCAAGTGGACCCGAGGGACTGCAGCAGGGGAACTGAG			68
Sbjct	TTACAGCTCCGACCTTCCCAAGTGGACCCGAGGGACTGCAGCAGGGGAACTGAG			568622
Query 61	GGGAACAGAGATCCGACAGAGTGTGGGCTGGCCATGGCCACTTGGCCGAGCAA			120
Sbjct	GGGAACAGAGATCCGACAGAGTGTGGGCTGGCCATGGCCACTTGGCCGAGCAA			568682
Query 121	CTTCCGGAGTGGGTCCACALTCACACCGCCGCCATGGCCAGCTCATGTGGGG			180
Sbjct	CTTCCGGAGTGGGTCCACALTCACACCGCCGCCATGGCCAGCTCATGTGGGG			568742
Query 181	GAGCCGACGGCTGCCCTGGCATCTTCACTGGAGAGAGGAGGACTTATCCATCC			240
Sbjct	GAGCCGACGGCTGCCCTGGCATCTTCACTGGAGAGAGGAGGACTTATCCATCC			568802
Query 241	GGGGCTCCCTGGCTCAGAGGCTTCCAGACTCTTCCAGGGGACGAGGCAATGG			300
Sbjct	GGGGCTCCCTGGCTCAGAGGCTTCCAGACTCTTCCAGGGGACGAGGCAATGG			568862
Query 301	CACCAAGAGAGATCCGACAGAGTGTGGGCTGGCCATGGCCACTTGGCCGAGCAA			360
Sbjct	CACCAAGAGAGATCCGACAGAGTGTGGGCTGGCCATGGCCACTTGGCCGAGCAA			568922
Query 361	CTGCTCAGGCTGAGGGCCGTGAGGGCTGCGGATGGCCAGGCTCTCCCGTAGCT			420
Sbjct	CTGCTCAGGCTGAGGGCCGTGAGGGCTGCGGATGGCCAGGCTCTCCCGTAGCT			568982
Query 421	GGCCGCAAGGCCACATGGGCGGCTACTGTGGTGGAGTGGCCGCGCAACAGCA			480
Sbjct	GGCCGCAAGGCCACATGGGCGGCTACTGTGGTGGAGTGGCCGCGCAACAGCA			569042
Query 481	CAACCACAGCCGCTTCCGCGCAAGTGGGCGCTTCCGACGATTGGAGAGAGCA			540
Sbjct	CAACCACAGCCGCTTCCGCGCAAGTGGGCGCTTCCGACGATTGGAGAGAGCA			569102
Query 541	GAACTCAGGCGCTGTGTGACAGAGTGGGCGGCTGTTCAGAGGATCCGAGGCTCT			600
Sbjct	GAACTCAGGCGCTGTGTGACAGAGTGGGCGGCTGTTCAGAGGATCCGAGGCTCT			569162
Query 601	AGCCGATAGCGCTCTGGGAGGGGGCGGTACGTGGCCCATCTTTCTTACTCC			660
Sbjct	AGCCGATAGCGCTCTGGGAGGGGGCGGTACGTGGCCCATCTTTCTTACTCC			569222
Query 661	GTTCTGAGAGGCGAATAGACACACACCCAGAGACACAGCAGCAGCACTAGTGGCC			720
Sbjct	GTTCTGAGAGGCGAATAGACACACACCCAGAGACACAGCAGCAGCACTAGTGGCC			569282
Query 721	CTGTGAGAGGCGAATAGACACACACCCAGAGACACAGCAGCAGCACTAGTGGCC			780
Sbjct	CTGTGAGAGGCGAATAGACACACACCCAGAGACACAGCAGCAGCACTAGTGGCC			569342
Query 781	GCAGGTTGCACAGCTGAAAGCCAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG			840
Sbjct	GCAGGTTGCACAGCTGAAAGCCAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG			569402

Figura 3.3. Clonagem da ilha CpG putativa presente na região subtelomérica do braço direito do cromossomo 10. (A) Gel de agarose contendo a amplificação do fragmento correspondente à ilha CpG putativa, demonstrando o tamanho correto de 800pb. (B) Blast do sequenciamento da ilha CpG obtida a partir de amplificação de DNA genômico de *L. major*.

As ilhas CpGs em geral são metiladas incluindo as ilhas CpGs localizadas no promotor do TERRA em humanos. Em humanos as ilhas CpGs são metiladas por ação de enzimas de metilação de DNA (principalmente DNMTs, DNA metil transferase), responsáveis pela adição do radical metil ao carbono 5 da citosina (m^5C), a fim de regular sua atividade transcricional (FARNUNG; GIULOTTO; AZZALIN, 2010; NERGADZE et al., 2009). Em *Leishmania*, como mencionado anteriormente, não há nenhum trabalho na literatura demonstrando a metilação de DNA como meio de controle transcricional. Com o intuito de detectar a presença de metilação nas ilhas CpGs putativas localizadas nas extremidades dos cromossomos em *L. major*, foi utilizado um método descrito por Singer-Sam e colaboradores (SINGER-SAM et al., 1990), que consiste em detectar sítios de metilação de DNA pelo uso de enzimas de restrição que são bloqueadas por metilação. Neste caso, a metilação bloqueia a ação endonucleolítica das enzimas de restrição que reconheceriam estes sítios e romperiam os mesmos entre as pontes fosfodiéster. Assim, por este método é possível amplificar por PCR fragmentos de DNA que não seriam digeridos por enzimas de restrição devido ao bloqueio do sítio por ação da metilação (Fig. 3.4).

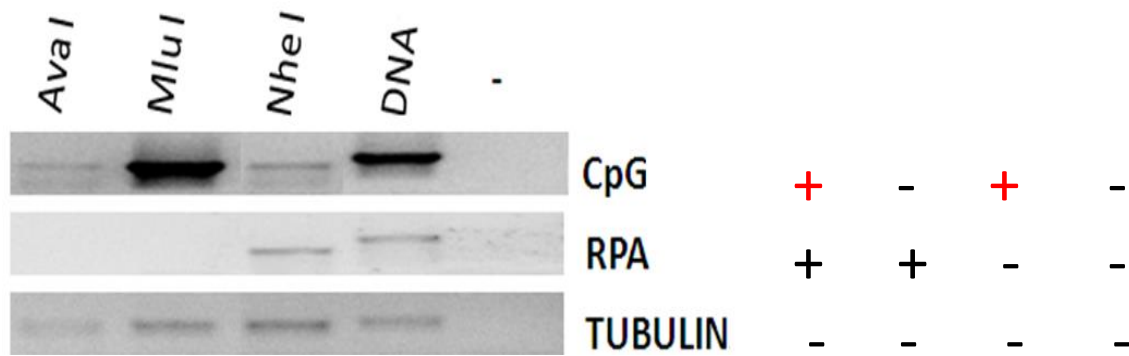


Figure 3.4. Detecção de sítios de metilação nas ilhas CpGs putativas encontradas na região subtelo mérica do braço direito do cromossomo 10. Digestão enzimática seguida de reação de PCR. Foi utilizado DNA genômico de *L. major* na forma promastigota e iniciadores específicos para a região putativa da ilha CpG localizada no braço direito da extremidade do cromossomo 10. Os genes RPA-1 e tubulina foram utilizados como controle positivo e negativo da digestão respectivamente. DNA genômico não digerido foi utilizado como controle positivo e água como controle negativo da reação de PCR. (-) Ausência de sítio de restrição, (+) Presença de sítio de restrição e (+) sítio de restrição bloqueado por metilação.

Como demonstrado na Fig. 3.4, foi possível amplificar o fragmento da região correspondente à ilha CpG, mesmo após a digestão do DNA com as enzimas correspondentes, sugerindo que estes sítios estão bloqueados por metilação de DNA. O mesmo não ocorreu com os controles, por exemplo, as digestões realizadas com a enzima *AvaI* e *MluI* digeriram internamente o fragmento correspondente ao gene que codifica a RPA-1, impossibilitando sua amplificação por PCR. Este resultado sugere que na ilha CpG putativa estas enzimas estejam com seus sítios de reconhecimento bloqueados, possivelmente pela m^5C . A utilização desta metodologia é apenas um indício da presença de metilação no DNA de *L. major*, por isso, foi realizada uma o tratamento do DNA genômico das três formas de desenvolvimento da *L. major*, com bissulfito de sódio seguido de sequenciamento de DNA (FROMMER et al., 1992) em colaboração com a Dra. Cristiane Alves, pós-doutora do laboratório, a fim de confirmar a existência da marca m^5C no genoma de *L. major* nas três formas de desenvolvimento e avaliar se o lncRNA TERRA possui sua expressão controlada por ilhas CpGs posicionadas em regiões subtelo méricas da extremidade do braço direito do cromossomo 10, o qual possui as mesmas características estruturais das extremidades cromossômicas que transcrevem o TERRA em humanos (Fig. 3.1).

Nos painéis mostrados na Figura 3.5, pode-se visualizar que ocorreu a conversão das citosinas em uracilas em praticamente todas as citosinas presentes nos fragmentos clonados das três formas de desenvolvimento avaliadas. Estes resultados demonstram que

não está ocorrendo metilação na região estudada, já que, se a metilação tivesse ocorrido, as citosinas estariam protegidas da conversão por bissulfito de sódio e permaneceriam como C após a reação de sequenciamento. As Cs não convertidas observadas no sequenciamento de dois clones (um proveniente do promastigota e um metacíclico), provavelmente são escapes do tratamento, pois sua frequência é muito baixa, o que não sugere a presença da metilação nestas bases e que o controle da expressão do lncRNA TERRA se dá por outros mecanismos que não a metilação do DNA nas regiões subteloméricas.

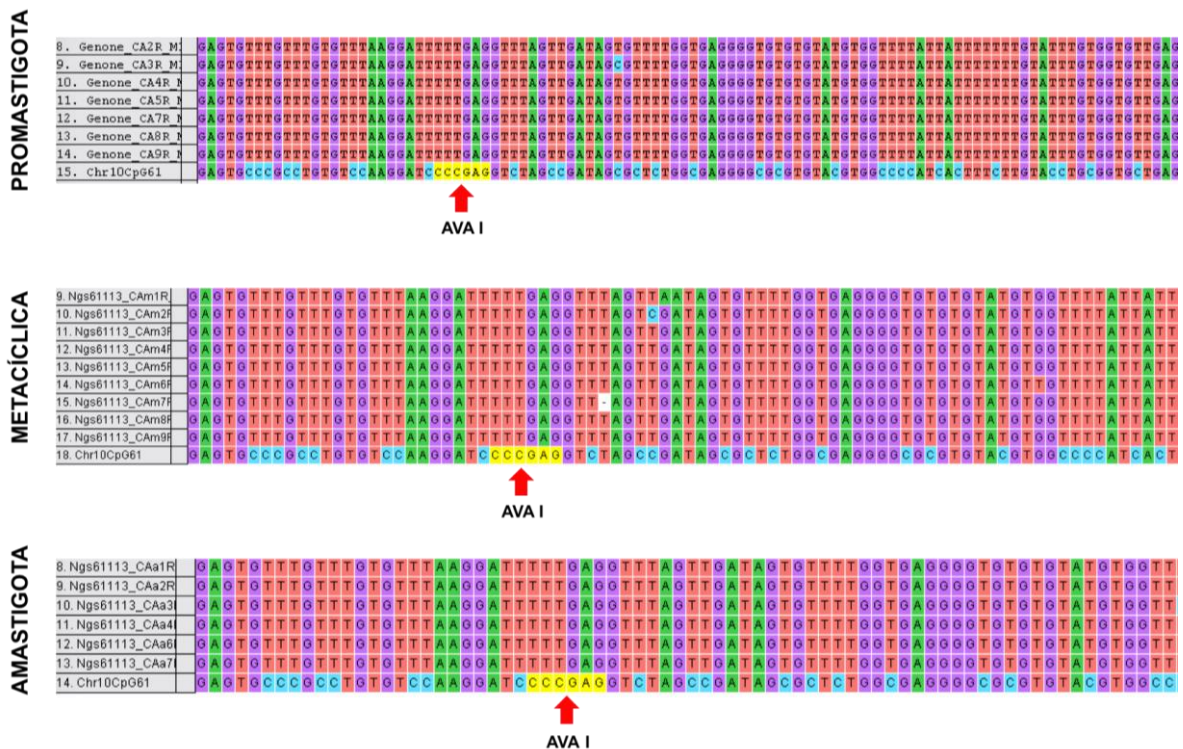


Figura 3.5. Sequenciamento de DNA da ilha CpG #61 putativa do cromossomo 10 da *L. major* das três formas de desenvolvimento (promastigota, metacíclica e amastigota) tratado com bissulfito de sódio para detecção da presença de m⁵C. As bases representadas pela cor roxa representam a Guanina, as bases representadas pela cor verde representam a Adenina, as bases representadas pela cor vermelha representam a Timina e as bases representadas pela cor azul representam a Citosina. Em amarelo, está o sítio de reconhecimento da enzima *Ava*I. A última linha de cada painel, está a sequência da ilha CpG #61 putativa do cromossomo 10 da *L. major*.

3.5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste capítulo, demonstram a existência de regiões ricas em G e C denominadas ilhas CpG nas extremidades cromossômicas de *L. major*, embora nem todas as extremidades que são transcritas apresentem as mesmas. Em relação a função destas sequências na regulação da transcrição do TERRA em *L. major*, nossos resultados ainda são muito preliminares para que se chegue em uma conclusão, pois só estudamos metilação em ilhas CpG putativas proveniente da extremidade do braço direita de um dos cromossomos que transcreve o TERRA. Análises mais robustas deverão ser feitas com mais algumas ilhas CpG putativas para confirmar estes achados.

CAPÍTULO 3

4. CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO DO TER EM *L. major*

4.1. INTRODUÇÃO

Os telômeros são estruturas nucleoprotéicas formadas por interações entre proteínas e por sequências de DNA repetitivas não codificadoras, localizados nas extremidades dos cromossomos (BLACKBURN; GALL, 1978; PRYDE; GORHAM; LOUIS, 1997). Na maioria dos organismos investigados, a síntese dos telômeros ou repetições teloméricas é realizada pelo complexo telomerase, (PARDUE et al., 1996; ZAKIAN, 1995). O complexo telomerase é responsável pela adição de DNA nas extremidades dos cromossomos, utilizando os próprios telômeros como substrato (BLACKBURN, 1990; GREIDER, 1996).

O complexo telomerase tem dois componentes principais, a transcriptase reversa ou TERT e o componente RNA, TER. Estes dois componentes têm sido caracterizados como o núcleo do complexo ribonucleoprotéico (BEATTIE et al., 1998; COLLINS; GANDHI, 1998), sendo que, a incapacidade de associação da telomerase com o componente RNA resulta na redução no tamanho dos telômeros (BOSOY et al., 2003). O componente TERT varia consideravelmente entre diferentes espécies, mas mantém os domínios conservados (XIA et al., 2000)(Giardini et al 2007). O componente do TER é mais variável tanto em sequência quanto em tamanho entre os diferentes organismos (LUE, 2004). No entanto, todos os TER descritos têm uma estrutura secundária conservada, o que lhes permite realizar funções similares e interagir com a TERT (LUE, 2004), sendo que mutações no TER são capazes de abolir a interação entre TER e TERT e resultam numa incapacidade de manter o tamanho dos telômeros (LIN et al., 2004). Entre os componentes estruturais conservados dos TER, está a região TBE (template boundary element), envolvida na interação com a telomerase e está localizada na porção 5' da molécula, a região do molde, que consiste na sequência reversa complementar da repetição telomérica, com tamanho aproximado de uma repetição e meia (LUE, 2004). Outras regiões importantes que tem sido descritas na interação TERT-TER, são as regiões de *pseudoknot* (AUTEXIER; LUE, 2006), domínio CR4/5 e *stem loops* que formam a estrutura secundária da molécula. Estes elementos afetam a atividade e processividade enzimática da telomerase (LUE, 2004); Cheng and Greider 2004).

Os componentes TER de *L. amazonensis* e *L. major* (LeishTER) foram recentemente caracterizados pelo nosso grupo, como RNAs longos não codificadores de aproximadamente 2.000 nucleotídeos, possivelmente um dos maiores componentes RNA da telomerase descritos até agora (VASCONCELOS et al., 2014). LeishTER na forma madura apresenta um cap 5' e uma cauda de poliadenilada putativa, sugerindo que ele sofre *trans-splicing*. LeishTER co-localiza com LaTERT no núcleo e é imunoprecipitada juntamente com a enzima. A predição de estrutura secundária de LeishTER mostra que a região do molde está localizada no terminal 5' do RNA, contém 12nt, é bastante conservada dentro do gênero *Leishmania* e compartilha alta similaridade com a sequência do molde de TbTER (GUPTA et al., 2013; SANDHU et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2014). LeishTER conserva algumas outras regiões próprias de TER de ciliados, como o domínio TBE e o Box C/D snoRNA, também conservado nos componentes TER em outros protozoários (VASCONCELOS et al., 2014). Desta forma o presente trabalho tem como um dos objetivos, caracterizar a função do TER na biologia telomérica da *Leishmania major*.

4.2. OBJETIVOS

4.2.1. Objetivo geral

- Caracterizar a função do longo RNA telomérico não codificador TER do complexo telomerase em *Leishmania major*.

4.2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os transcritos do TER nas três formas de desenvolvimento de *L. major*.

-Caracterizar a função do componente TER de *L. major*

4.3. Materiais e Métodos

4.3.1. Material biológico e condições de crescimento de *Leishmania major*

Para todos os experimentos foi utilizada a espécie *Leishmania major* cepa *L. major* (MHOM/IL/1980/FRIEDLIN) cedida pelo CLIOC (coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz) sob a sigla IOC/L2821. Formas promastigotas, foram cultivadas em estufa incubadora com temperatura de 28°C, utilizando o meio de cultura comercial 199 1X, pH 7.3 (Cultilab) suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino (Cultilab) inativado pelo calor (KAPLER; COBURN; BEVERLEY, 1990) e, adicionados solução 1X de antibióticos/antimicóticos (Cultilab).

4.3.2. Transformação genética de *Leishmania major*

Para a transformação genética de *Leishmania* foi utilizada *L. major* promastigota na fase logarítmica (5×10^8) utilizando o método *old method* como descrito em *Protocols for handling and working with Leishmania species* (MOTTRAM LAB, 2016).

4.3.3. Análises *in silico* do TER em bibliotecas de SL-Seq

As análises dos transcritos do TER foram realizadas utilizando bibliotecas de SL-Seq (CUYPERS et al., 2017) (Fig. 5) das três formas de desenvolvimento de *L. major*. Para localizar o TER no genoma de *L. major* foram utilizadas as coordenadas descritas Vasconcelos e colaboradores (VASCONCELOS et al., 2014) (LmjF25:333,307-335,419). O *software genome browser* ARTEMIS foi utilizado, e as buscas foram utilizadas utilizando o genoma de *Leishmania major* (RUTHERFORD et al., 2000). Foram identificados os números dos transcritos normalizados por RPKM (Reads Per Kilobase Million) tanto do TER quanto da TERT.

4.3.4. Construção do cassete de expressão contendo o TER de *L. major*

Foi realizada amplificação via PCR do gene que codifica o TER, a partir de DNA genômico utilizando iniciadores específicos TER-F e TER-R (Tabela suplementar 1) e *Platinum®Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). Os iniciadores utilizados para amplificação contêm sítios para as enzimas de restrição *Sma* I e *Bgl* II, os produtos da amplificação foram fracionados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo a 0,1µg/ml e visualizado através de transluminador sob luz ultravioleta. O *amplicom* foi clonado em vetor de clonagem pGEM^(R)-T Easy (promega) seguindo as recomendações do fabricante. Foram utilizadas células competentes *Escherichia coli* cepa DH5α

eletrocompetentes para transformação genética. Após, as bactérias foram plaqueadas em placa de Pertri contendo meio LB (Luria-Bertani) sólido com o antibiótico de seleção (Ampicilina). As colônias foram selecionadas através de PCR com os iniciadores M13 (Tabela suplementar 1). Posteriormente, foi feita a minipreparação para extração do DNA plasmidial, utilizando o kit comercial *PureLink® 96 HQ Mini Plasmid DNA Purification Kit* (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. Após a minipreparação, foi realizada outra PCR para confirmação da clonagem do fragmento e, posteriormente, os clones foram enviados para sequenciamento Sanger. As sequências foram avaliadas utilizando o *software* CLC Sequence Viewer 7.6 e submetidos à pesquisa junto ao banco de dados do NCBI, website (“BLAST: Basic Local Alignment Search Tool”, [s.d.]) utilizando a ferramenta BLAST. O fragmento do RNA TER será posteriormente subclonado em vetor de expressão pX63-Neo em *L. major* para futuras análises funcionais.

4.3.5. Construção do plasmídeo para edição gênica do RNA TER via CRISPR-Cas9

Para a realização da edição genética do RNA TER utilizando o sistema CRISPR-Cas9 foram utilizados dois plasmídeos: i-Plasmídeo que expressa a endonuclease Cas9 (pTCAS9) e ii-Plasmídeo contendo as regiões de homologia e o *seed* (RNA guia utilizado pela endonuclease Cas9). O plasmídeo pTCAS9 e o plasmídeo vazio para serem inseridas as regiões de homologia e o *seed* (denominado pLS6) foram gentilmente cedidos pelo prof. Dr. Yvon Sterkers do Instituto Pasteur (*Leishmania* Consortium).

Para a construção do plasmídeo contendo as regiões de homologia e o RNA guia, foram escolhidas duas regiões de homologia do gene *LmTER* denominadas HR1 (451pb) e HR2 (411pb) presentes respectivamente nas extremidades 5´ e 3´ do gene. O *seed* foi determinado entre as regiões de homologia utilizando ferramentas disponibilizadas online (“CRISPR gRNA (guide RNA) Design Tool for Eukaryotic Pathogens”, [s.d.]). Para escolha dessas sequencias e montagem do sistema tivemos orientação dos Dr. Noelia Lander e Miguel Chiurillo, Depto de Patología Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAP, São Paulo. O mapa do plasmídeo (denominado pLS7-LmTERT) contendo as regiões de homologia para o RNA TER e a *seed* foi gerada no programa *SnapGene® versão 3.2.1* (“SnapGene | Software for everyday molecular biology”, [s.d.]) conforme mostrado na Fig. 4.1.

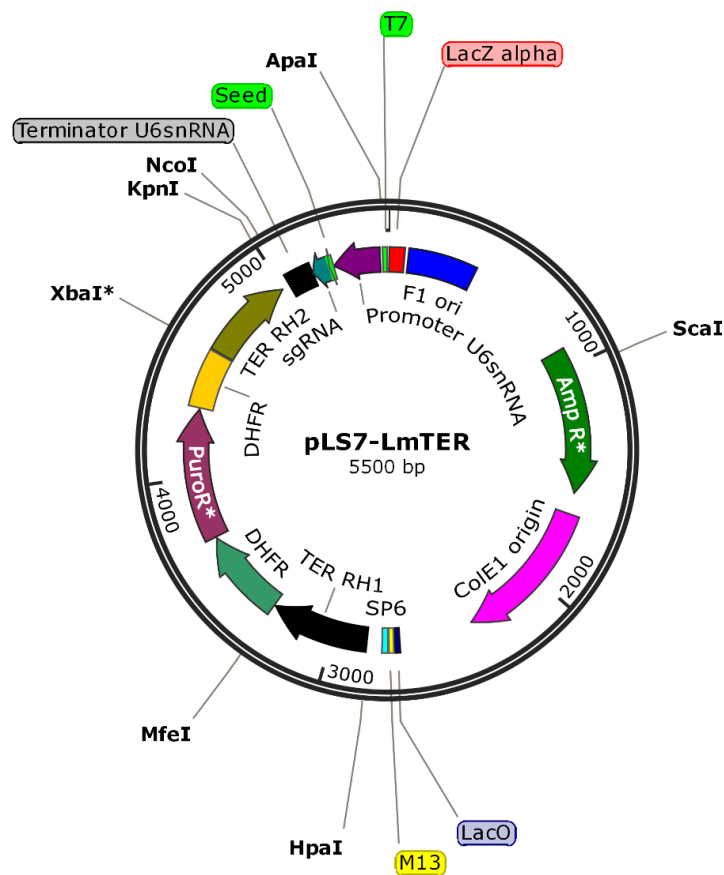


Figura 4.1. Mapa do pLS7-LmTERT, demonstrando as regiões HR1, HR2, *Seed* e sítios para as principais enzimas a serem utilizadas. Figura gerada pelo programa *SnapGene*®, versão 3.2.1 (“*SnapGene* | Software for everyday molecular biology”, [s.d.]).

As HRs juntamente com a *Seed* foram sintetizadas comercialmente pela empresa Genone sendo que os fragmentos TER-HR2 e a *Seed* foram clonadas como um único fragmento e a TERT-HR1 como um fragmento separado em outro plasmídeo (pGEM-T easy). Tais fragmentos serão devidamente removidos e subclonados no pLS6 vazio para a construção do plasmídeo pLS7-LmTERT (Fig. 4.1). Linhagens puras contendo o plasmídeo pTCAS9 em *L. major* já foram selecionadas e clonadas e estão disponíveis no nosso laboratório para ensaios futuros.

4.3.6. Padronização e utilização dos oligonucleotídeos antisense do tipo *morpholinos* para *knockdown* do TER

Células de *L. major* na forma promastigota, em fase logarítmica tardia (5×10^7) foram utilizadas para a transformação com oligonucleotídeos *morpholinos* controle marcados com fluoresceína (FITC). Estes oligonucleotídeos foram usados durante a

padronização dos ensaios de transformação e são controles fornecidos pelo fabricante dos *morpholinos* (“Morpholino Antisense Oligos | Gene Tools, LLC”, [s.d.]).

A transformação dos parasitos com o oligo *morpholino* controle foi realizada por electroporação utilizando o método *old method* (MOTTRAM LAB, 2016). Para estes ensaios foram utilizados 1.5 e 10µM do oligonucleotídeo *morpholino* controle marcado com fluoresceína na posição 3' (Fluoresceinated standard control, 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA 3'). Após a electroporação, as células ficaram em recuperação em volume total de 1 mL de meio 199 na incubadora, a 28°C por 12 horas. Após 12 horas, foram realizadas 10 coletas a cada 7 horas (baseadas no ciclo de duplicação de *L. major* segundo (MOTTRAM LAB, 2016). Em cada coleta, foram retirados 90µL do meio de cultura contendo as células transformadas para fixação das mesmas com formalina 1%. Em seguida elas foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente e submetidas a diversas etapas de lavagem com PBS 1X.

Após, as células foram colocadas em lâminas previamente tratadas com poli-lisina 0,1% e foi adicionado VECTASHIELD contendo DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) para coloração de núcleo e cinetoplasto. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Nikon 80i e as imagens foram capturadas utilizando o programa NIS elements (Version Ar 3.10).

Após a padronização, foi utilizado o oligo *morpholino* Carboxi-fluoresceinated LmTERT (Tabela suplementar 1) para inibir a maturação do RNA TER (Fig. 4.2). Como controles foram utilizadas células de *L. major* transformadas com oligo *morpholino* LmTER invertido (Tabela1) e células transformadas sem nenhum oligo *morpholino*.

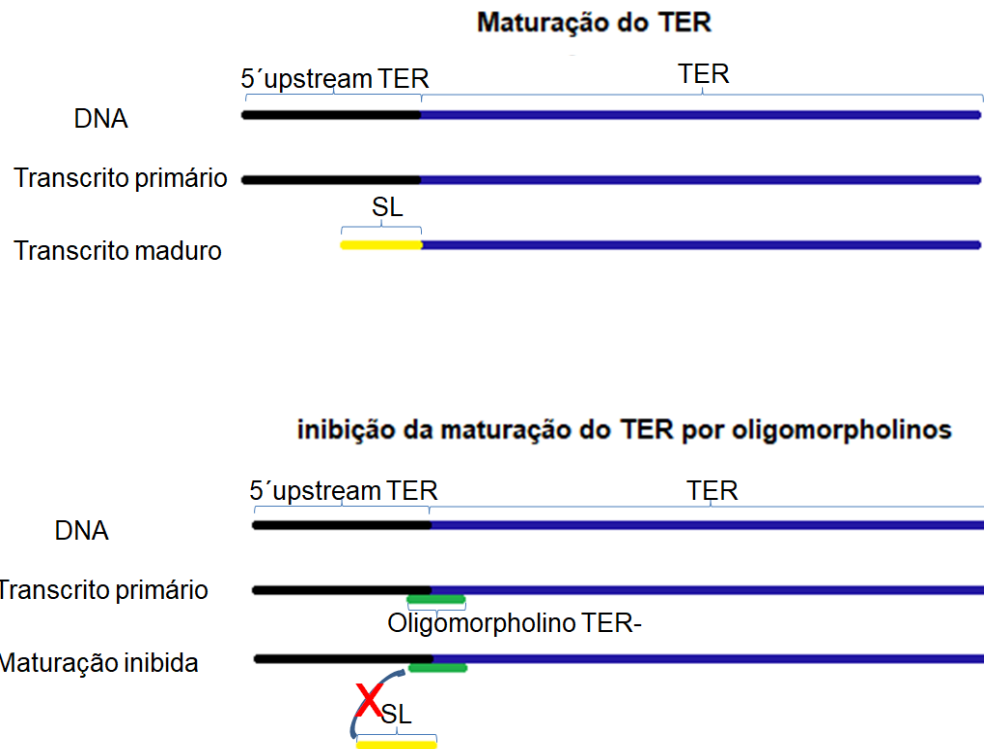


Figura 4.2. Esquema de inibição da maturação do transcrito TER utilizando oligo *morpholinos*

4.4. RESULTADOS E DISCUSAO

4.4.1. Caracterização da função do TER

Com o intuito de caracterizar a função do TER, inicialmente foram verificados os níveis de transcrição do TER nas bibliotecas de SL-Seq das três formas de desenvolvimento do parasita. As buscas foram baseadas nas coordenadas do TER (LmjF25:333,307-335,419) previamente descrito (VASCONCELOS et al., 2014) utilizando o *genome browser* ARTEMIS para o genoma de *Leishmania major* (RUTHERFORD et al., 2000).

Como o TER é componente intrínseco do complexo telomerase, foi realizada uma análise comparativa entre o número de transcritos do componente proteico TERT e o número de transcritos TER provenientes das três formas de desenvolvimento do parasita (Fig. 4.3). Os resultados mostraram que os transcritos TER são menos abundantes que transcritos TERT nas três formas de desenvolvimento do parasito, na ordem amastigota>metacíclicos>promastigota> (Fig. 4.3). Como o controle de expressão genica em *L. major* assim como em outros tripanosomatídeos é pós-transcricional (TEIXEIRA; VALENTE, 2016) é possível que os níveis de transcrição mostrados na figura 4.3 não indiquem que todos esses RNAs serão traduzidos para proteína, no caso a TERT, ou maturados, no caso do TER. A atividade telomerase foi detectada em extratos proteicos de formas promastigotas de *L. major* (CANO et al., 1999) e em extratos proteicos de *L. amazonenses* nas formas amastigota (dados não publicados) e promastigota (GIARDINI et al., 2011) indicando que baixos níveis de expressão de TER são suficientes para a ação do complexo telomerase.

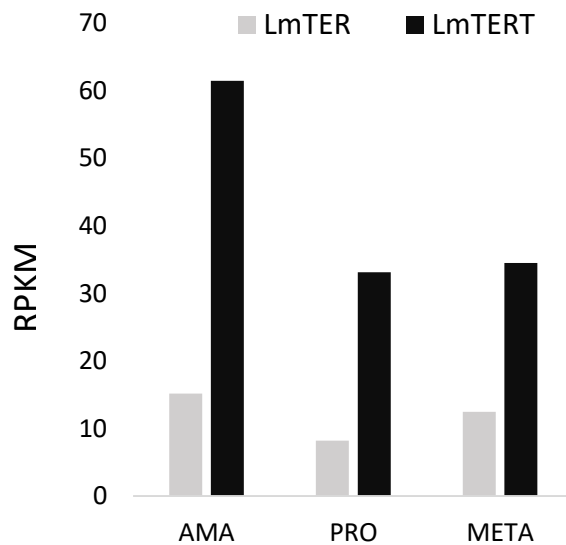


Figura 4.3. Número de transcritos (RPKM) correspondentes aos componentes TER e TERT da telomerase de *L. major*. As barras correspondem ao número de transcritos TER (cinza) e TERT (preto) nas três formas de desenvolvimento do parasito: amastigota (ama), promastigota (pro) e metacíclica (meta), calculados com base nos dados obtidos das bibliotecas SL-Seq.

Para melhor entendimento do papel desenvolvido pelo TER na manutenção telomérica estão sendo geradas em nosso laboratório linhagens de *L. major* modificadas geneticamente superexpressando o TER, inicialmente foi clonado e sequenciado o TER. inicialmente foi clonado e sequenciado o TER a partir de DNA genômico (Fig. 4.4, anexo 5) para posteriormente ser subclonado em vetor de expressão, seguido de transformação em *L. major* para análises funcionais. Também será editado o TER do genoma (*knockout*) por substituição gênica utilizando a metodologia do CRISPR-Cas9. Aqui mostramos ensaios de inibição da transcrição do TER (*knockdown*) utilizando a metodologia de oligonucleotídeos *morpholinos* antisense (próximo tópico).

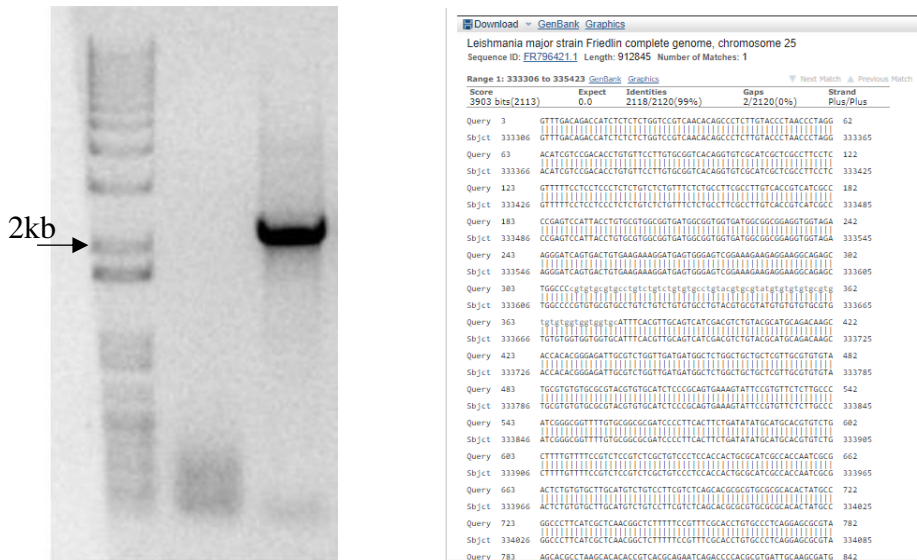


Figura 4.4. Clonagem do TER. (A) Gel de agarose contendo a amplificação do fragmento correspondente ao TER, demonstrando o tamanho correto de 2.2Kb. (B) Blast do sequenciamento do TER obtido a partir de amplificação de DNA genômico de *L. major*.

4.4.2. Inibição da maturação do transcrito TER (*knockdown*)

O TER de *Leishmania* (LeishTER), recentemente descrito pelo nosso grupo (VASCONCELOS et al., 2014), é codificado por um gene localizado em um locus sintênico no cromossomo 25 de cinco espécies de *Leishmania*. Todos os TER descritos têm uma estrutura secundária conservada o que lhes permite realizar funções similares e interagir com a região TRBD, altamente conservada entre as TERTs (LUE, 2004). Com o intuito de afetar a manutenção dos telômeros por meio da inibição da interação entre TER e TERT foi realizado o *knockdown* do TER utilizando a metodologia dos oligonucleotídeos *morpholinos* antisense.

A técnica de *knockdown* utilizando oligonucleotídeos *Morpholinos* antisense consiste em abolir a maturação de um transcrito específico (“Morpholino Antisense Oligos | Gene Tools, LLC”, [s.d.]). *Morpholinos* são ácidos nucleicos artificiais capazes de parear de forma complementar com sequências específicas de ácidos nucleicos naturais. Atualmente são utilizados a fim de provocar o bloqueio sítio-específico da tradução, o *splicing* ou atividade de ribozimas em moléculas de RNA. Por serem artificiais, não são reconhecidos por enzimas ou proteínas sinalizadoras, nem degradados por nucleases ou reconhecidos pelo sistema imune, ou seja, são estáveis nas células. Em contraste com a maquinaria de interferência de RNA, os *morpholinos* não degradam o RNA, eles simplesmente impedem sua interação com o complexo enzimático até o RNA

ser degradado de forma natural. Além disso, em *Leishmania* a utilização de técnicas baseadas na maquinaria de RNA de interferência, a fim de provocar o *knockdown* é inviável em grande parte das espécies do gênero, pela ausência dessa maquinaria (ROBINSON; BEVERLEY, 2003).

Antes de dar início aos ensaios funcionais, foi necessária a padronização desta metodologia. Como mostrado na figura 4.5 se observa o sinal da fluorescência emitida pela molécula *morpholino* controle, 26 horas após a transformação, o que sugere que a transformação genética foi realizada com sucesso em formas promastigotas de *L. major*. Como esperado e conforme relatado pelo fabricante, o *morpholino* se apresenta difundido por toda a célula do protozoário (“Morpholino Antisense Oligos | Gene Tools, LLC”, [s.d.]). Em *L. major* a eficiência de internalização na célula foi entre 30 e 40 %. Esta metodologia foi padronizada junto com outro integrante do laboratório e será o primeiro relato de sua utilização em *Leishmania* ssp..

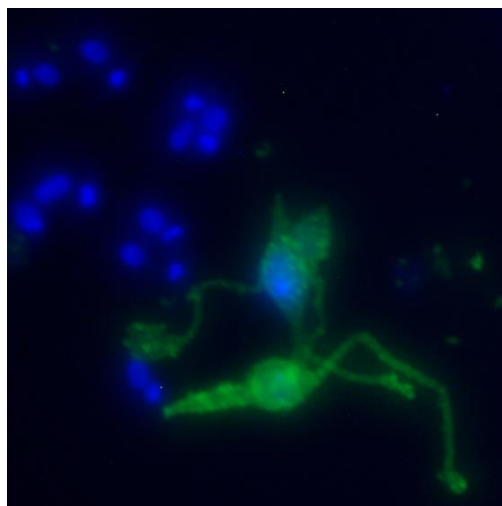


Figura 4.5. Localização celular do *morpholino* controle em formas promastigotas de *L. major*. O sinal verde demonstra a internalização dos morpholinos em *L. major* transfectadas com 10 μ M, 26 horas após a transfecção. O DAPI (azul) marca o núcleo e kinetoplasto das células. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência Nikon 80i, capturadas usando o software NIS.

Após a padronização da técnica foi utilizado o oligo *morpholino* LmTER (5'GTCTGTCAA ACTGAAGAGGGAAGGG3') para inibir a maturação do TER. Este oligo *morpholino* foi marcado com fluoresceína com o intuito de auxiliar na localização subcelular do oligonucleotídeo após a transformação dos parasitos com os mesmos. Nestes ensaios foram utilizadas as mesmas condições usadas para o *morpholino* controle.

Como controle do ensaio foram utilizadas formas promastigotas de *L. major* transformadas com oligo *morpholino* LmTER reverso (5'GGGAAGGGAGAAGTCAAAGTCTG 3') e formas promastigotas que passaram pelos mesmo processos porém não foram transformadas com nenhum *morpholino*. É importante ressaltar que ambos controles não devem provocar inibição da maturação do TER. Como mostrado na figura 4.5, ao contrário do oligo *morpholino* controle cuja fluorescência aparece difusa por toda a célula, o *morpholino* LmTER aparece na forma de focos individuais dentro do núcleo (Fig. 4.6). Porém, a semelhança do que ocorreu com o oligo *morpholino* controle (Fig.4.5), somente 30 a 40% dos parasitos transfectados apresentaram sinais de fluorescência.

Desta forma, os próximos passos serão proceder com os ensaios funcionais para se verificar alteração de expressão de LmTER usando RT-PCR e RT-qPCR. Efeitos na morfologia e perfil de crescimento do parasito transformado e alterações no tamanho dos telômeros também serão verificadas, já que o intuito deste ensaio é impedir que o componente RNA do complexo telomerase do parasito (LeishTER) possa atuar no complexo, inibindo indiretamente a atividade da enzima. Se bem sucedida esta será uma ferramenta fundamental para a realização de ensaios *knockdown* em *Leishmania*.

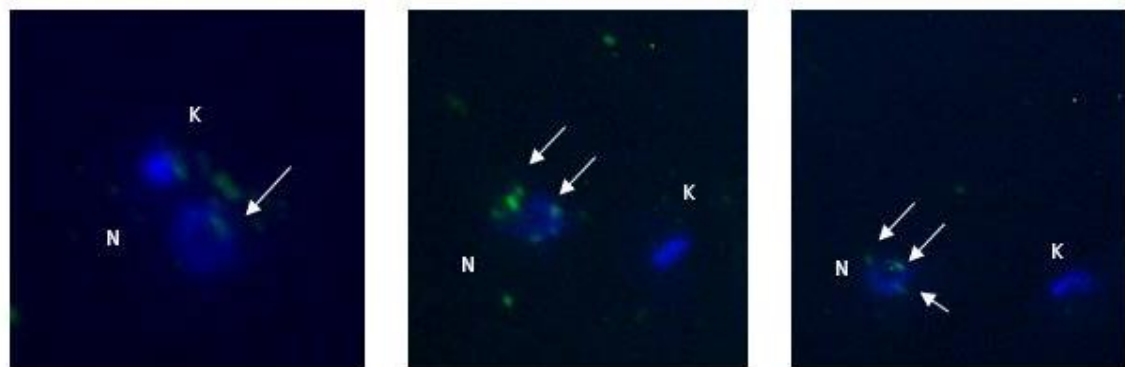


Figura 4.6. Localização celular do *morpholino* LmTER em formas promastigotas de *L. major*. O sinal verde dentro do núcleo dos parasitos demonstra a internalização dos *morpholinos* em *L. major* ~24 horas após a transfecção com 10 μ M de oligonucleotídeo. DAPI (azul) marca o núcleo e cinetoplasto das células. Imagens obtidas em aumento de 100X, utilizando microscópio de fluorescência Nikon 80i, capturadas usando o software NIS.

4.5. CONCLUSÃO

Neste capítulo podemos sugerir que os níveis de transcritos TER nas três fases de desenvolvimento em *L. major* não apresentam diferenças significativas quando comparado a outros organismos. Para contribuir com o entendimento da função do TER foram desenvolvidas metodologias em *Leishmania* para diminuir ou abolir a expressão do TER mediante o uso de morpholinos e o sistema CRISPR0/Cas9. Porém, ainda estamos na fase de início das análises e ainda não foi possível se obter resultados suficientes que demonstrem a função do TER em *L. major*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAMI, R.; SHAPIRA, M. Nucleotide sequence of the spliced leader RNA gene from *Leishmania mexicana amazonensis*. **Nucleic acids research**, v. 20, n. 7, p. 1804, 11 abr. 1992.

ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 2, p. 109–118, 1 fev. 2012.

ARORA, R. et al. RNaseH1 regulates TERRA-telomeric DNA hybrids and telomere maintenance in ALT tumour cells. **Nature communications**, v. 5, p. 5220, 21 out. 2014.

ARORA, R.; AZZALIN, C. M. Telomere elongation chooses TERRA alternatives. **RNA Biology**, v. 12, n. 9, p. 938–941, 2 set. 2015.

ARORA, R.; BRUN, C. M. C.; AZZALIN, C. M. TERRA: Long Noncoding RNA at Eukaryotic Telomeres. In: [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 65–94.

AUTEXIER, C.; LUE, N. F. The Structure and Function of Telomerase Reverse Transcriptase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 493–517, jun. 2006.

AZZALIN, C. M. et al. Telomeric Repeat Containing RNA and RNA Surveillance Factors at Mammalian Chromosome Ends. **Science**, v. 318, n. 5851, p. 798–801, 2 nov. 2007.

AZZALIN, C. M.; LINGNER, J. Telomere functions grounding on TERRA firma. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 1, p. 29–36, jan. 2015.

BAH, A. et al. The telomeric transcriptome of *Schizosaccharomyces pombe*. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 7, p. 2995–3005, abr. 2012.

BAHLER, J. et al. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. **Yeast**, v. 14, n. 10, p. 943–951, jul. 1998.

BALK, B. et al. Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence. **Nature structural & molecular biology**, v. 20, n. 10, p. 1199–205, 8 out. 2013.

BARBIÉRI, C. L.; DOINE, A. I.; FREYMULLER, E. Lysosomal depletion in macrophages from spleen and foot lesions of *Leishmania*-infected hamster. **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 2, p. 218–228, ago. 1990.

BARRETT, M. P. et al. The trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1469–1480, 1 nov. 2003.

BAUR, J. A. et al. Telomere Position Effect in Human Cells. **Science**, v. 292, n. 5524, p. 2075–2077, 15 jun. 2001.

BEATTIE, T. L. et al. Reconstitution of human telomerase activity in vitro. **Current biology : CB**, v. 8, n. 3, p. 177–80, 29 jan. 1998.

BERMAN, J. Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Current infectious disease reports**, v. 7, n. 1, p. 33–38, jan. 2005.

BESTEIRO, S. et al. Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 16, p. 11384–96, 21 abr. 2006.

BLACKBURN, E. H. Telomeres and their synthesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 249, n. 4968, p. 489–90, 3 ago. 1990.

BLACKBURN, E. H. Cell biology: Shaggy mouse tales. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 922–923, 18 ago. 2005.

BLACKBURN, E. H.; COLLINS, K. Telomerase: an RNP enzyme synthesizes DNA. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 5, 1 maio 2011.

BLACKBURN, E. H.; GALL, J. G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. **Journal of molecular biology**, v. 120, n. 1, p. 33–53, 25 mar. 1978.

BLASCO, M. A. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 4, p. 299–309, abr. 2007.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 15 ago. 2017.

BORST, P. Discontinuous Transcription and Antigenic Variation in Trypanosomes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 701–732, jun. 1986.

BOSOY, D. et al. Conserved N-terminal motifs of telomerase reverse transcriptase required for ribonucleoprotein assembly in vivo. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 6, p. 3882–90, 7 fev. 2003.

BRAULT, M.; D’SOUZA, Y.; AUTEXIER, C. Telomerase: evolution, structure and function. In: **Origin and Evolution of Telomeres**. [s.l.: s.n.]. p. 1–17.

CANO, M. I. et al. Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 7, p. 3616–21, 30 mar. 1999.

CHAN, S. R. W. L.; BLACKBURN, E. H. Telomeres and telomerase. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1441, p. 109–122, 29 jan. 2004.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. S7–S16, nov. 2007.

CHEN, J.-L.; GREIDER, C. W. An emerging consensus for telomerase RNA structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 41, p. 14683–4, 12 out. 2004.

CHEN, J. L.; BLASCO, M. A.; GREIDER, C. W. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. **Cell**, v. 100, n. 5, p. 503–14, 3 mar. 2000.

CHEN, Y. et al. A Shared Docking Motif in TRF1 and TRF2 Used for Differential Recruitment of Telomeric Proteins. **Science**, v. 319, n. 5866, p. 1092–1096, 22 fev. 2008.

CHIANG, Y. J. et al. Expression of telomerase RNA template, but not telomerase reverse transcriptase, is limiting for telomere length maintenance in vivo. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 16, p. 7024–31, ago. 2004.

CHIURILLO, M. A. et al. Organization of telomeric and sub-telomeric regions of chromosomes from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 173–183, 25 maio 1999.

CHU, H. P. et al. TERRA RNA Antagonizes ATRX and Protects Telomeres. **Cell**, v. 170, n. 1, p. 86–101.e16, 2017.

COLLINS, K.; GANDHI, L. The reverse transcriptase component of the *Tetrahymena* telomerase ribonucleoprotein complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 15, p. 8485–90, 21 jul. 1998.

CONTE, F. F.; CANO, M. I. N. Genomic organization of telomeric and subtelomeric sequences of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 13, p. 1435–1443, nov. 2005.

CpG Islands. Disponível em: <http://www.bioinformatics.org/sms2/cpg_islands.html>. Acesso em: 15 ago. 2017.

CRISPR gRNA (guide RNA) Design Tool for Eukaryotic Pathogens. Disponível em: <<http://grna.ctegd.uga.edu/>>. Acesso em: 18 ago. 2017.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 111–26, jan. 2006.

CUSANELLI, E.; CHARTRAND, P. Telomeric repeat-containing RNA TERRA: a noncoding RNA connecting telomere biology to genome integrity. **Frontiers in genetics**, v. 6, p. 143, 2015.

CUSANELLI, E.; ROMERO, C. A. P.; CHARTRAND, P. Telomeric Noncoding RNA TERRA Is Induced by Telomere Shortening to Nucleate Telomerase Molecules at Short Telomeres. **Molecular Cell**, v. 51, n. 6, p. 780–791, 26 set. 2013.

CUYPERS, B. et al. Multiplexed Spliced-Leader Sequencing: A high-throughput, selective method for RNA-seq in Trypanosomatids. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3725, 16 dez. 2017.

DA SILVA, M. S. et al. In: DNA Replication and Mutation Nuclear DNA Replication in Trypanosomatid Protozoa. [s.d.].

DA SILVA, R.; SACKS, D. L. Metacyclogenesis is a major determinant of Leishmania promastigote virulence and attenuation. **Infection and immunity**, v. 55, n. 11, p. 2802–6, nov. 1987.

DAS, S. et al. Unmethylated CpG motifs in the L. donovani DNA regulate TLR9-dependent delay of programmed cell death in macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 97, n. 2, p. 363–378, 1 fev. 2015.

DE LANGE, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. **Genes & Development**, v. 19, n. 18, p. 2100–2110, 15 set. 2005.

DILLON, L. A. L. et al. Transcriptomic profiling of gene expression and RNA processing during Leishmania major differentiation. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 14, p. 6799–813, 18 ago. 2015.

DMITRIEV, P. V.; PETROV, A. V.; DONTSOVA, O. A. Yeast Telosome Complex: Components and Their Functions. **Biochemistry (Moscow)**, v. 68, n. 7, p. 718–734, 2003.

ECKHARDT, F. et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. **Nature Genetics**, v. 38, n. 12, p. 1378–1385, 29 dez. 2006.

ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 4, p. 286–298, 6 abr. 2007.

FARNUNG, B. O.; GIULOTTO, E.; AZZALIN, C. M. Promoting transcription of chromosome ends. **Transcription**, v. 1, n. 3, p. 140–143, nov. 2010.

FLYNN, R. L. et al. Alternative lengthening of telomeres renders cancer cells hypersensitive to ATR inhibitors. **Science**, v. 347, n. 6219, p. 273–277, 16 jan. 2015.

FROMMER, M. et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 5, p. 1827–31, 1 mar. 1992.

FU, G.; BARKER, D. C. Rapid cloning of telomere-associated sequence using primer-tagged amplification. **BioTechniques**, v. 24, n. 3, p. 386–90, mar. 1998.

FU, G.; PERONA-WRIGHT, G.; BARKER, D. C. Leishmania braziliensis: Characterisation of a Complex Specific Subtelomeric Repeat Sequence and Its Use in the Detection of Parasites. **Experimental Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 236–243, nov. 1998.

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. **Journal of molecular biology**, v. 196, n. 2, p. 261–82, 20 jul. 1987.

GIARDINI, M. A. et al. Leishmania amazonensis: Partial purification and study of the biochemical properties of the telomerase reverse transcriptase activity from promastigote-stage. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 243–248, jan. 2011.

GIARDINI, M. A. et al. Telomere and Telomerase Biology. In: **Progress in molecular biology and translational science**. [s.l: s.n.]. v. 125p. 1–40.

GILSON, E.; GÉLI, V. How telomeres are replicated. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 825–838, out. 2007.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International journal for parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027–34, 15 set. 2003.

GOTTSCHLING, D. E. et al. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. **Cell**, v. 63, n. 4, p. 751–62, 16 nov. 1990.

GRAF, M. et al. Telomere Length Determines TERRA and R-Loop Regulation through the Cell Cycle. **Cell**, v. 170, n. 1, p. 72–85.e14, 2017.

GREENWOOD, J.; COOPER, J. P. Non-coding telomeric and subtelomeric transcripts are differentially regulated by telomeric and heterochromatin assembly factors in fission yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 7, p. 2956–2963, abr. 2012.

GREIDER, C. W. Telomere Length Regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 337–365, jun. 1996.

GUEVARA, P. et al. Green fluorescent protein-tagged *Leishmania* in phlebotomine sand flies. **Journal of medical entomology**, v. 38, n. 1, p. 39–43, jan. 2001.

GULL, K. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 443–52, 1 maio 2001.

GUPTA, C. L. et al. Cross talk between *Leishmania donovani* CpG DNA and Toll-like receptor 9: An immunoinformatics approach. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 459, n. 3, p. 424–429, 10 abr. 2015.

GUPTA, S. K. et al. The *Trypanosoma brucei* telomerase RNA (TER) homologue binds core proteins of the C/D snoRNA family. **FEBS Letters**, v. 587, n. 9, p. 1399–1404, 2 maio 2013.

HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 569–577, dez. 2007.

HENDERSON, E. R.; BLACKBURN, E. H. An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. **Molecular and cellular biology**, v. 9, n. 1, p. 345–8, jan. 1989.

Home - NEB | New England Biolabs. Disponível em: <<https://international.neb.com/>>. Acesso em: 18 ago. 2017.

HUG, N.; LINGNER, J. Telomere length homeostasis. **Chromosoma**, v. 115, n. 6, p. 413–425, 27 out. 2006.

IGLESIAS, N. et al. Subtelomeric repetitive elements determine TERRA regulation by Rap1/Rif and Rap1/Sir complexes in yeast. **EMBO reports**, v. 12, n. 6, p. 587–593, 28 jun. 2011.

INBAR, E. et al. The Transcriptome of *Leishmania major* Developmental Stages in Their Natural Sand Fly Vector. **mBio**, v. 8, n. 2, p. e00029-17, 3 maio 2017.

JOHNSTON, D. A. et al. Genomics and the biology of parasites. **BioEssays**, v. 21, n. 2, p. 131–147, 12 fev. 1999.

KAPLER, G. M.; COBURN, C. M.; BEVERLEY, S. M. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. **Molecular and cellular biology**, v. 10, n. 3, p. 1084–94, mar. 1990.

KILLICK-KENDRICK, R.; MOLYNEUX, D. H.; ASHFORD, R. W. Ultrastructural observations on the attachment of *Leishmania* in the sandfly. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 4, p. 269, 1974.

- KIM, N. W. et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science (New York, N.Y.)**, v. 266, n. 5193, p. 2011–5, 23 dez. 1994.
- LANDER, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860–921, 15 fev. 2001.
- LANDFEAR, S. M.; WIRTH, D. F. Structure of mRNA encoded by tubulin genes in *Leishmania enriettii*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 15, n. 1, p. 61–82, abr. 1985.
- LARSEN, F. et al. CpG islands as gene markers in the human genome. **Genomics**, v. 13, n. 4, p. 1095–107, ago. 1992.
- LEBOWITZ, J. H. et al. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. **Genes & development**, v. 7, n. 6, p. 996–1007, jun. 1993.
- LIN, J. et al. A universal telomerase RNA core structure includes structured motifs required for binding the telomerase reverse transcriptase protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 41, p. 14713–14718, 12 out. 2004.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LONDOÑO-VALLEJO, J. A.; WELLINGER, R. J. Telomeres and telomerase dance to the rhythm of the cell cycle. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 37, n. 9, p. 391–399, set. 2012.
- LÓPEZ DE SILANES, I. et al. Identification of TERRA locus unveils a telomere protection role through association to nearly all chromosomes. **Nature communications**, v. 5, p. 4723, 3 set. 2014.
- LUE, N. F. Adding to the ends: what makes telomerase processive and how important is it? **BioEssays**, v. 26, n. 9, p. 955–962, set. 2004.
- LUKE, B. et al. The Rat1p 5' to 3' Exonuclease Degrades Telomeric Repeat-Containing RNA and Promotes Telomere Elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Cell**, v. 32, n. 4, p. 465–477, 21 nov. 2008.
- MAICHER, A. et al. Deregulated telomere transcription causes replication-dependent telomere shortening and promotes cellular senescence. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 14, p. 6649–6659, 2012.
- MEDINA-ACOSTA, E.; CROSS, G. A. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple “mini-prep” procedure. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 59, n. 2, p. 327–9, jun. 1993.
- MILLER, S. I.; LANDFEAR, S. M.; WIRTH, D. F. Cloning and characterization of a *Leishmania* gene encoding a RNA spliced leader sequence. **Nucleic acids research**, v. 14, n. 18, p. 7341–60, 25 set. 1986.
- MONTERO, J. J. et al. Telomeric RNAs are essential to maintain telomeres. **Nature Communications**, v. 7, p. 12534, 17 ago. 2016.
- MORAVEC, M. et al. TERRA promotes telomerase-mediated telomere elongation in *Schizosaccharomyces pombe*. **EMBO reports**, v. 17, n. 7, p. 1–14, 2016.
- Morpholino Antisense Oligos | Gene Tools, LLC**. Disponível em: <http://www.gene-tools.com/morpholino_antisense_oligos>. Acesso em: 15 ago. 2017.
- MORTAZAVI, A. et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, v. 5, n. 7, p. 621–628, 30 jul. 2008.
- MOTTRAM LAB. **Leishmania Protocols for Dummies Nov16.pdf - Google Drive**. Disponível em: <<https://drive.google.com/file/d/0B5D4RaiMgCsKb0hBb0hxZ2VDRzg/view>>. Acesso em: 15 ago. 2017.
- MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496,

p. 1561–1577, out. 2005.

NANAVATY, V. et al. Trypanosoma brucei RAP1 maintains telomere and subtelomere integrity by suppressing TERRA and telomeric RNA:DNA hybrids. **Nucleic acids research**, v. 45, n. 10, p. 5785–5796, 2 jun. 2017.

NAWROCKI, E. P.; EDDY, S. R. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. **Bioinformatics**, v. 29, n. 22, p. 2933–2935, 15 nov. 2013.

NERGADZE, S. G. et al. CpG-island promoters drive transcription of human telomeres. **RNA**, v. 15, n. 12, p. 2186–2194, 1 dez. 2009.

NETO, J. L. S. et al. Leishmania replication protein A-1 binds in vivo single-stranded telomeric DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, n. 2, p. 417–423, 2007.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

PARDUE, M. L. et al. Drosophila telomeres: new views on chromosome evolution. **Trends in genetics : TIG**, v. 12, n. 2, p. 48–52, fev. 1996.

PFEIFFER, V. et al. TERRA Promotes Telomere Shortening through Exonuclease 1–Mediated Resection of Chromosome Ends. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 6, p. e1002747, 14 jun. 2012.

PFEIFFER, V. et al. The THO complex component Thp2 counteracts telomeric R-loops and telomere shortening. **The EMBO journal**, v. 32, n. 21, p. 2861–71, 30 out. 2013.

PONGER, L.; LI, W.-H. Evolutionary Diversification of DNA Methyltransferases in Eukaryotic Genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 4, p. 1119–1128, abr. 2005.

PORRO, A. et al. Molecular Dissection of Telomeric Repeat-Containing RNA Biogenesis Unveils the Presence of Distinct and Multiple Regulatory Pathways. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 20, p. 4808–4817, 15 out. 2010.

PREVENTION, C.-C. FOR D. C. AND. CDC - Leishmaniasis. [s.d.].

PRYDE, F. E.; GORHAM, H. C.; LOUIS, E. J. Chromosome ends: all the same under their caps. **Current opinion in genetics & development**, v. 7, n. 6, p. 822–8, dez. 1997.

RASTROJO, A. et al. The transcriptome of Leishmania major in the axenic promastigote stage: transcript annotation and relative expression levels by RNA-seq. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 223, 4 abr. 2013.

RAUCH, T. A. et al. A human B cell methylome at 100-base pair resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 3, p. 671–678, 20 jan. 2009.

REIS-CUNHA, J. L. et al. Trypanosomatid Genome Organization and Ploidy. In: SILVA, M. S. DA; CANO, M. I. N. (Eds.). **Frontiers in Parasitology (Volume 1) Molecular and Cellular Biology of Pathogenic Trypanosomatids**. [s.l.: s.n.]. p. 43.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROBINSON, K. A.; BEVERLEY, S. M. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite Leishmania. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 128, n. 2, p. 217–28, maio 2003.

RUDENKO, G.; VAN DER PLOEG, L. H. Transcription of telomere repeats in protozoa. **The EMBO journal**, v. 8, n. 9, p. 2633–8, set. 1989.

RUTHERFORD, K. et al. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, v. 16, n. 10, p. 944–945, 1 out. 2000.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 453–483, out. 2001.

- SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 223, n. 4643, p. 1417–9, 30 mar. 1984.
- SANDHU, R. et al. A trans-spliced telomerase RNA dictates telomere synthesis in *Trypanosoma brucei*. **Cell Research**, v. 23, n. 4, p. 537–551, 12 abr. 2013.
- SCHOEFTNER, S.; BLASCO, M. A. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 2, p. 228–236, 23 fev. 2008.
- SEKARAN, V.; SOARES, J.; JARSTFER, M. B. Telomere Maintenance as a Target for Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 3, p. 521–538, 13 fev. 2014.
- SIMPSON, A. et al. Early Evolution within Kinetoplastids (Euglenozoa), and the Late Emergence of Trypanosomatids. **Protist**, v. 155, n. 4, p. 407–422, 1 dez. 2004.
- SINGER-SAM, J. et al. Use of a HpaII-polymerase chain reaction assay to study DNA methylation in the P_{gk}-1 CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation. **Molecular and cellular biology**, v. 10, n. 9, p. 4987–9, set. 1990.
- SMOGORZEWSKA, A.; DE LANGE, T. Regulation of Telomerase by Telomeric Proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 177–208, jun. 2004.
- SnapGene | Software for everyday molecular biology**. Disponível em: <<http://www.snapgene.com/>>. Acesso em: 15 ago. 2017.
- SoftBerry - CpGfinder HELP**. Disponível em: <<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=cpgfinder&group=help&subgroup=promoter>>. Acesso em: 18 ago. 2017.
- STONE, M. D. et al. Stepwise protein-mediated RNA folding directs assembly of telomerase ribonucleoprotein. **Nature**, v. 446, n. 7134, p. 458–461, 22 mar. 2007.
- TEIXEIRA, S. M. R.; VALENTE, B. M. Mechanisms Controlling Gene Expression in Trypanosomatids. In: SILVA, M. S. DA; CANO, M. I. N. (Eds.). **Frontiers in Parasitology (Volume 1) Molecular and Cellular Biology of Pathogenic Trypanosomatids**. [s.l.: s.n.]. p. 30.
- VASCONCELOS, E. J. R. et al. The Putative *Leishmania* Telomerase RNA (LeishTER) Undergoes Trans-Splicing and Contains a Conserved Template Sequence. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112061, 12 nov. 2014.
- VERMELHO, A. B. et al. Carbonic anhydrases from *Trypanosoma* and *Leishmania* as anti-protozoan drug targets. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 1543–1555, mar. 2017.
- WEBER, M. et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. **Nature Genetics**, v. 37, n. 8, p. 853–862, 10 ago. 2005.
- WHO | Leishmaniasis. **WHO**, 2017.
- WRIGHT, W. E. et al. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. **Genes & development**, v. 11, n. 21, p. 2801–9, 1 nov. 1997.
- XIA, J. et al. Identification of functionally important domains in the N-terminal region of telomerase reverse transcriptase. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 14, p. 5196–207, jul. 2000.
- YU, T.-Y.; KAO, Y.; LIN, J.-J. Telomeric transcripts stimulate telomere recombination to suppress senescence in cells lacking telomerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 9, p. 3377–82, 4 mar. 2014.
- ZAKIAN, V. A. Telomeres: beginning to understand the end. **Science (New York, N.Y.)**, v. 270, n. 5242, p. 1601–7, 8 dez. 1995.

ZAPPULLA, D. C.; CECH, T. R. From The Cover: Yeast telomerase RNA: A flexible scaffold for protein subunits. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 27, p. 10024–10029, 6 jul. 2004.

ZAPPULLA, D. C.; GOODRICH, K.; CECH, T. R. A miniature yeast telomerase RNA functions in vivo and reconstitutes activity in vitro. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, n. 12, p. 1072–1077, 20 dez. 2005.

6. ANEXOS

Anexo 1. Resultados normalizados em RPKM das extremidades dos 36 cromossomos de *L. major* obtidos das análises nas bibliotecas SL-Seq

		Localização sinal SL (nt)	AMASTIGOTA AH045	PROMASTIGOTA AH043	METACÍCLICA AH044
Cr.1	Esquerdo	514..1014	16,87	7,843	37,916
	Direito	267996..268496	3,233	14,833	6,896
Cr.2	Esquerdo	660..1160	8,234	0,941	6,641
	Direito	355070..355570	2,209	8,47	4,284
Cr.3	Esquerdo	39..539	134,957	43,919	157,232
	Direito	382633..383133	0,402	0	0
Cr.4	Esquerdo	1935..2435	0,803	0	0
	Direito	471243..471747	1,004	0	0
Cr.5	Esquerdo	2425..2923	2,008	0	0,643
	Direito	464743..465243	40,367	12,548	65,763
Cr.6	Esquerdo	207..707	0,201	0,314	1,499
	Direito	515564..516064	97,603	45,488	111,39
Cr.7	Esquerdo	786..1286	13,054	3,451	23,778
	Direito	594822..595322	19,681	4,078	29,775
Cr.8	Esquerdo	3073..3573	0	0	0,214
	Direito	574378..574878	0	0	0
Cr.9	Esquerdo	1746..2246	0	0	0,214
	Direito	572009..572509	0	0	0
Cr.10	Esquerdo	1116..1616	7,431	2,196	15,637
	Direito	568137..568637	30,526	16,627	41,986
Cr.11	Esquerdo	957..1457	0,402	0	0
	Direito	581910..582410	1,205	0,941	1,714
Cr.12	Esquerdo	198..698	0,402	0	0
	Direito	673787..674287	3,414	1,569	5,355
Cr.13	Esquerdo	645..1145	0,201	0	0,428
	Direito	652654..653154	0,201	0	0
Cr.14	Esquerdo	870..1370	5,623	0,314	0,643
	Direito	620778..621278	21,288	9,411	33,845
Cr.15	Esquerdo	357..857	18,878	6,588	22,492
	Direito	627492..627992	1,205	0	1,285
Cr.16	Esquerdo	400..900	127,326	32,312	241,631
	Direito	714012..714512	0,201	0,314	0,857
Cr.17	Esquerdo	903..1403	1,205	0,314	0,643
	Direito	682964..683464	4,418	0,941	4,07
Cr.18	Esquerdo	735..1235	1,607	0,314	3,642
	Direito	738632..739132	13,054	4,078	26,991
Cr.19	Esquerdo	699..1299	44,699	11,245	34,821
	Direito	701479..701979	47,797	18,509	67,477

Cr.20	Esquerdo	1479..1979	79,93	41,096	90,826
	Direito	740629..741129	0	0	0
Cr.21	Esquerdo	1374..1874	6,627	0,627	7,283
	Direito	771448..771948	3,816	2,51	4,713
Cr.22	Esquerdo	1317..1817	31,731	14,744	36,202
	Direito	715815..716315	0,602	0	1,071
Cr.23	Esquerdo	757..1257	2,209	0	0
	Direito	770300..770800	4,017	0	4,284
Cr.24	Esquerdo	1920..2420	0,402	0	0
	Direito	840073..840573	3,816	1,255	3,427
Cr.25	Esquerdo	1818..2318	1,205	0,627	0,857
	Direito	910268..910768	24,702	3,765	32,989
Cr.26	Esquerdo	720..1220	59,044	16,627	71,761
	Direito	1089941..1090441	5,222	1,255	16,923
Cr.27	Esquerdo	1176..1676	3,012	1,255	3,427
	Direito	1129388..1129888	0,602	0,627	0,428
Cr.28	Esquerdo	453..953	2,41	0,627	0,214
	Direito	1158246..1158746	4,217	0,627	2,571
Cr.29	Esquerdo	288..792	1,793	0	1,275
	Direito	1210488..1210988	89,369	22,273	124,457
Cr.30	Esquerdo	1473..1973	9,238	5,961	26,134
	Direito	1397822..1398322	14,661	8,784	24,42
Cr.31	Esquerdo	1557..2057	7,431	3,137	12,21
	Direito	1483014..1483514	22,292	17,568	42,2
Cr.32	Esquerdo	1575..2075	7,029	2,823	12,424
	Direito	1603890..1604390	40,166	12,548	67,691
Cr.33	Esquerdo	486..986	26,71	9,725	51,197
	Direito	1582297..1582797	4,418	1,882	4,498
Cr.34	Esquerdo	390..890	5,422	1,255	7,497
	Direito	1864900..1865400	21,087	6,902	29,99
Cr.35	Esquerdo	306..806	7,431	7,215	13,281
	Direito	2089541..2090041	8,033	3,451	16,066
Cr.36	Esquerdo	1260..1760	7,632	0,941	8,997
	Direito	2679877..2680377	8,033	0,627	10,496

Anexo 2. Resultados do diagrama de Venn

Nomes	Total	Elementos
AMA META PRO	16	Chr8-es0 Chr11-es0 Chr9-es0 Chr4-di0 Chr8-di0 Chr22-di0 Chr20-di0 Chr24-es0 Chr16-di0 Chr13-es0 Chr13-di0 Chr27- di0 Chr9-di0 Chr4-es0 Chr3-di0 Chr12-es0
AMA PRO	2	Chr35-es7 Chr6-es0
AMA META	6	Chr21-es7 Chr27-es3 Chr17-di4 Chr15-di1 Chr23-di4 Chr33- di4
META PRO	6	Chr23-es0 Chr5-es0 Chr28-es0 Chr25-es0 Chr17-es0 Chr14- es0
AMA	48	Chr22-es32 Chr7-di20 Chr5-di40 Chr21-di4 Chr5-es2 Chr31- es7 Chr30-es9 Chr30-di15 Chr28-di4 Chr11-di1 Chr35-di8 Chr32-es7 Chr14-es6 Chr23-es2 Chr14-di21 Chr3-es135 Chr31-di22 Chr1-es17 Chr29-es2 Chr20-es80 Chr6-di98 Chr16-es127 Chr36-di8 Chr26-es59 Chr25-di25 Chr10-di31 Chr7-es13 Chr34-di21 Chr12-di3 Chr32-di40 Chr2-di2 Chr2- es8 Chr36-es8 Chr24-di4 Chr26-di5 Chr19-es45 Chr28-es2 Chr1-di3 Chr17-es1 Chr25-es1 Chr15-es19 Chr18-es2 Chr33-es27 Chr19-di48 Chr34-es5 Chr29-di89 Chr18-di13 Chr10-es7
PRO	48	Chr24-di1 Chr12-di2 Chr26-di1 Chr2-es0 Chr23-di0 Chr15- di0 Chr32-es3 Chr5-di13 Chr15-es7 Chr10-di17 Chr36-di0 Chr20-es41 Chr32-di13 Chr3-es44 Chr22-es15 Chr30-es6 Chr6-di45 Chr7-di4 Chr28-di0 Chr21-es0 Chr33-es10 Chr16- es32 Chr1-es8 Chr31-di18 Chr25-di4 Chr29-es0 Chr1-di15 Chr21-di3 Chr19-di19 Chr36-es0 Chr29-di22 Chr34-es1 Chr30-di9 Chr18-di4 Chr11-di0 Chr10-es2 Chr34-di7 Chr18- es0 Chr17-di0 Chr33-di2 Chr35-di3 Chr26-es17 Chr2-di8 Chr7-es3 Chr27-es1 Chr14-di9 Chr19-es11 Chr31-es3
META	44	Chr36-di10 Chr31-es12 Chr6-di111 Chr6-es1 Chr2-di4 Chr30-es26 Chr29-di124 Chr7-di30 Chr35-di16 Chr24-di3 Chr29-es1 Chr5-di66 Chr34-di30 Chr18-di27 Chr34-es7 Chr19-es35 Chr30-di24 Chr3-es157 Chr20-es91 Chr1-es38 Chr32-es12 Chr16-es242 Chr26-di17 Chr11-di2 Chr12-di5 Chr2-es7 Chr10-di42 Chr15-es22 Chr31-di42 Chr14-di34 Chr28-di3 Chr36-es9 Chr33-es51 Chr32-di68 Chr7-es24 Chr19-di67 Chr10-es16 Chr25-di33 Chr1-di7 Chr18-es4 Chr35-es13 Chr26-es72 Chr21-di5 Chr22-es36

Anexo 3. Sequência de nucleotídeos de uma parte do transcrito TERRA de *L. major* originado do braço direito do cromossomo 10, obtida a partir de sequenciamento automático de cDNA.

CACACCGTGAACGCAAGGAAACGCATTGCAGCTCTGCTACGCTCTTTGTTGA
GCGGAAGCCTTCGCAGAACGCACCACCACGGAAGTGAGTGTGAGGGGAAA
CGGGCGAATTTCCGCTAACGTTTTTATCCACGGGTACGGGTGAGGGTACGG
ATGTACTCGTCAGGGTCAGGGTTAGGGTTTTGCTCTCCACTGATTCCTTGCA
CAGCGACACCCTCTCCAGCTGGACGGGTGCGTGACGGTGTACTACTGTACT
GGTGTACGGGTGTGCTACTGTACTGGTTAGGGTTAGGG

Anexo 4. Sequência de nucleotídeos da ilha CpG putativa presente em posição subtelomérica no braço direito do cromossomo 10, obtida a partir de sequenciamento automático de DNA genômico.

TTCAGCCTCCGACCCTTCCCCAGCTGGAGCCCGGAGGACTGCACGACGAGG
GAACGTGAGGGGAACAGAGATCCGCGACAAGGTGTTGGGCTGGGCCATCG
CCGACTCTGGCCGGAGCAACTTCCGCGAGTGCGGTCCCACACTACCACCG
CCCGCCATGGCGACCAGCTCATGTGGGGGAGCGCCAGCGCTGCCCTCGCCA
TCTTCACTGGAAGAAGAGGGGAAGACCTTATCCATCGCGGCGGCTGCGTGCC
GGTCAAGAGGCCGTTCCAGAGTCTCTCAGGGGCACGAGGCGATGGGCACCA
AGGAGGAGCTGCGCGTGCCTGCGTGGGCATCGAGAGGGTGTGCCCTGCGG
ACCACGTGCTCAGGCTGAGGCCGGCTGAGGGCATCGCGGTGACGCAGGGCC
TCTGCCGCTAGCTGCGCGCCAAGGCCACCATGGGCGCGCTACTTGGTGGTG
AGGTGAGCCGGCGCAACGACGACAACCACGACCGCCGCTTCGCCGCAAGG
TGGGCCGCTTCCCGACGATTGTGAAGGACGAGAAGTCCAAGCGCCTGCTGT
GCAACGAGTGCCCGCCTGTGTCCAAGGATCCCCGAGGTCTAGCCGATAGCG
CTCTGGCGAGGGGCGCGTGTACGTGGCCCCATCACTTTCTTGTACCTGCGGT
GCTGAGAAGGCGAATAGACACAACACCCGAAGACAGCAGCAGCAGCACTA
GTGGCCGCGTATGCGGCAGTAGCGGCACACCGAGACGCAACCAGGGACGC
ACACACCTTCAGAGCCAGCACGGTTGCACACCGTGAACGCAAGGAAACGCA
TTGCAGCTCTGCTACGCTCTTTGTTG

Anexo 5. Sequência de nucleotídeos do componente TER de *L. major* (LeishTER, Genbank Acc# MF784563), obtida a partir de sequenciamento automático de DNA genômico.

TTGTTTGACAGACCATCTCTCTCTGGTCCGTCAACACAGCCCTCTTGTACCCT
AACCCCTAGGACATCGTCCGACACCTGTGTTCCCTTGTGCGGTCACAGGTGTGCG
CATCGCTCGCCTTCCTCGTTTTTCCTCCTCCCTCTCTGTCTCTGTTTCTCTGCC
TTCGCCCTTGTCACCGTCATCGCCCCGAGTCCATTACCTGTGCGTGGCGGTGA
TGGCGGTGGTGTATGGCGGCGGAGGTGGTAGAAGGGATCAGTGA CTGTGAA
GAAAGGATGAGTGGGAGTCGGAAAGAAGAGGAAGGCAGAGCTGGCCCCGT
GTGCGTGCCTGTCTGTCTGTGTGCCTGTACGTGCGTATGTGTGTGTGCGTGT
GTGTGGTGGTGGTGCATTTACGTTGCAGTCATCGACGTCTGTACGCATGCA
GACAAGCACCACACGGGAGATTGCGTCTGGTTGATGATGGCTCTGGCTGCT
GCTCGTTGCGTGTGTATGCGTGTGTGCGCGTACGTGTGCATCTCCCGCAGTG
AAAGTATTCGGTGTCTCTTGGCCATCGGGCGGTTTTGTGCGGGCGCGATCCC
CTTCACTTCTGATATATGCATGCACGTGTCTGCTTTTTGTTTTCCGTCTCCGTC
TCGCTGTCCCTCCACCACTGCGCATCGCCACCAATCGCGACTCTGTGTGCTT
GCATGTCTGTCCCTTCGTCTCAGCACGCGCGTGCGCGCACACTATGCCGGCCC
TTCATCGCTCAACGGCTCTTTTTCCGTTTCGCACCTGTGCCCTCAGGAGCGC
GTAAGCACGCCTAAGCACACACCGTCACGCAGAATCAGACCCACGCGTGA
TTGCAAGCGATGCGGCCTCTCACTGCAGTCGAGGTGGGGCAACGGGCGCAG
TCCGCCCTTCTCCCTTTCTCATTGCTTTTCAGTATGCTGGCCTTCTCGCCGTC
GGTGAGGGTGTATGTGTGTGCGTGCGGGCGTGTGGTGCACCACCATGGAC
TGTGAGAACTAGCACGGCCACTCAGGCATGCACACATAACGTGCACGTGC
ACGTGCACACGCGCGTGCACCGACTTTGTAGCGCGATCCTCCGCCTCTCCAG
TGTCGCGCACTTTGCGCTCTCTCTCGTGTGCTTTTCTCTCTCTACCTACAT
CTGCATCGGTGCGATGTTGCATGCAAAGAACAGGATGGAAGTGGAAGTGGG
GAAGTTACGTGACGCAAGAGAGAAGAGACGGGGAAGCGTTTTTCAGAGG
CGGGTGCGCACACGTGCGGCGTGTCTTGTGCGTGTGTGTGTGTGCATGTCAA
GCCACCTTAGCAAATAGGGGAGGTGGGAGGTGTTTACTGTGTCCACTTGCCT
GTCGCATCGCACTGCCCGGCGTATCCGTGTGCGCAAGCATGTGTGTGCGATCT
GTGCAATATCTGTGTGTTTGGGGTGTCTTTCGCGTGCCTGAGACCGAGGGGGT
CGGAACGAGTGGTGGAGGGGCCACGGCTGCCCTTGTGTGTGCACGCCGCGT
ACGAGAAGAAGAGGGAGGGTGGGTGAGCATGAGGCCTGGTGTGATGGTG
CGGTGAAGAGGTGATGCGAGAGAATCGGGTGAGAAGGGGCTAGCTGGTGG
GAAGTACGCTCGTGTGTATGTGTGTGTGTGTGTGTGCCCGTCTCGTGTGGAG
AGGGGGCGGGAAGCAGACGGCGGTGATAGGCAGGGTCCTGTGGTGTGTTG
GTGATGGGGCGGAGAATGTAAAGGAAAGCCAAGATGCGGAGAAGAACTGT
GACTGAGCATGTCATCTGAGAAAGTGAGGGGTGGTGTGCAAAGAGGGGC
ACAGACGACGGAGAAGTGGCGTGCACCTTGCCTGTCTGTCCACGTATGTGTG
TGCGTATGCGTATATGTCTATGTGTGGGTGCGCGAGAGTTCGCTGGTCTTGC
TGTGGATGCCGAATGCGCGGCAGCCGTGTCCTGTGGCTATGGAGCTGCCCT
TCTTCCCGTTTTTATCGACGCCACGCTGCGGTTCCCTCGATGCACTGTTGCG
AGTCGATAAAGGCGAAAGAGAGTGGGGGAGGGGCAACGAGCGGCGCTCCTG
GGTGCCTCAAGATGCGCATGTGTGTCTCGTGGAGGAAGGGAGATGAGGG
AAGACGAAAG

APÊNDICE E MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela suplementar 1. Iniciadores e sondas utilizados neste trabalho.

Iniciadores e sondas	Sequência
LmTERT (<i>morpholino</i>)	5'GTCTGTCAAACCTGAAGAGGGGAAGGG3'
LmTER reverso (<i>morpholino</i>)	5'GGGAAGGGAGAAGTCAAACCTGTCTG 3'
M13-F	5'GTAAAACGACGGCCAG 3'
M13-R	5'CAGGAAACAGCTATGAC 3'
TER-F	5'CCCGGGTTTGACAGACCA 3'
TER-R	5'AGATCTCTTTCGTCTTCC 3'
SubCro.03-es-F	5'CCCATCCATTCTTTTCAGA 3'
SubCro.03-es-R	5'ATCCAGTAAGGCTGCGAAGA 3'
SubCro.09-es-F	5'TCTCTTGCCAGCCTCTCTTC 3'
SubCro.09-es-R	5'GTTTTTATTGCCGAGGCTTG 3'
SubCro.20-es-F	5'GCGCCGTGTATTTTCAGTCT 3'
SubCro.20-es-R	5'ACTTCGCCCATCATATCAGC 3'
SubCro.29-es-F	5'CTCGATGTGGTTCTTGCTGA 3'
SubCro.29-es-R	5'AACGTTCGAATGGTGGAGAC 3'
SubCro.03-di- F	5'AGCACAGACACCGCTAATCC 3'
SubCro.03-di- R	5'- TGTGGTGTGGTTATTGTTTGTG -3
SubCro.09-di- F	5'GGCCCTACTCTGGTTTCCTC 3'
SubCro.09-di- R	5'-TGCGTTGTCAGCTTTTGCAG-3'
SubCro.10-di- F	5' CACACCGTGAACGCAAGGAAAC 3'
SubCro.10-di- R	5'-TCCGTGGTGGTGCATTCT-3'
SubCro.24-di- F	5'TCCTCCGATTCGTCTCTGTT 3'
SubCro.24-di- R	5'-GCACGCTACGCGAAAAGC-3'
SubCro.29-di- F	5'ATGGGGATTAAGGGAAGCAC 3'
SubCro.29-di- F	5'-GAATCAGTGGAGAGAAAAACGCATA-3'
OligodT	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
Telômero-R	5'TAACCCCTAACCCCTAAC 3'
RPA F	5'ATGCAGCAGCCAGGCAG 3'
RPA R	5'TCAGACGTAAGCCTCG 3'
Ilha_CpG10d-F	5'GTCGACTTCAGCCTCCGA 3'
Ilha_CpG10d-R	5'AATGTCGACCTGCGAAGG 3'
Tubulina F	5'CTCGTCGTTCTCTCGACATT 3'
Tubulina R	5'CGCGAGGTCACCGCCGGGCACAACG 3'
DIG-TEL-G	5'TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG 3'
DIG-TEL-C	5'CCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAA 3'

Apêndice 1

Artigo publicado em: **BBA General Subjects**

A CALMODULIN-LIKE PROTEIN (LCalA) IS A NEW *LEISHMANIA* AMAZONENSIS CANDIDATE FOR TELOMERE END-BINDING PROTEIN

Edna G. O. Morea^{1#}, Maria Alejandra Viviescas^{1#}, Carlos A. H. Fernandes^{2#}, Fabio F. Matioli², Cristina B. B. Lira¹, Maribel F. Fernandez³, Barbara S. Moraes⁴, Marcelo S. da Silva⁵, Camila B. Storti¹, Marcos R. M. Fontes², Maria Isabel N. Cano¹

These authors contributed equally to the paper

¹Genetics Dept., Biosciences Institute, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil; ²Biophysics and Physics Dept., Biosciences Institute, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil; ³Instituto Tocantinense Presidente Antonio Carlos LTDA., ITPAC-Porto Nacional S.A., TO, Brazil; ⁴PROAHSA - Programa de Estudos Avançados em Administração Hospitalar e Sistemas de Saúde, São Paulo; ⁵Laboratório Especial de Ciclo Celular, Center of Toxins, Immune Response and Cell Signaling (CeTICS), Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil

*Corresponding author: Genetics Dept., Biosciences Institute, São Paulo State University (UNESP), SP, CEP 18618-689, Brazil. Tel.: +55 14 3880 0388.

E-mail address: micano@ibb.unesp.br

Background

Leishmania spp. telomeres are composed of 5'-TTAGGG-3' repeats associated with proteins. We have previously identified LaRbp38 and LaRPA-1 as proteins that bind the G-rich telomeric strand. At that time, we had also partially characterized a protein:DNA complex, named LaGT1, but we could not identify its protein component.

Methods and results

Using protein-DNA interaction and competition assays, we confirmed that LaGT1 is highly specific to the G-rich telomeric single-stranded DNA. Three protein bands, with LaGT1 activity, were isolated from affinity-purified protein extracts in-gel digested, and sequenced *de novo* using mass spectrometry analysis. *In silico* analysis of the digested peptide identified them as a putative calmodulin with sequences identical to the *T. cruzi* calmodulin. In the *Leishmania* genome, the calmodulin ortholog is present in three identical copies. We cloned and sequenced one of the gene copies, named it LCalA, and obtained the recombinant protein. Multiple sequence alignment and molecular modeling showed that LCalA shares homology to most eukaryotes calmodulin. In addition, we demonstrated that LCalA is nuclear, partially co-localizes with telomeres and binds *in vivo* the G-rich telomeric strand. Recombinant LCalA can bind specifically and with relative affinity to the G-rich telomeric single-strand and to a 3'G-overhang, and DNA binding is calcium dependent.

Conclusions

We have described a novel candidate component of *Leishmania* telomeres, LCalA, a nuclear calmodulin that binds the G-rich telomeric strand with high specificity and relative affinity, in a calcium-dependent manner.

General significance

LCalA is the first reported calmodulin that binds *in vivo* telomeric DNA.

Keywords *Leishmania amazonensis*, telomere end-binding protein, telomerase, calcium, calmodulin

**NUCLEAR AND KINETOPLAST DNA REPLICATION IN
TRYPANOSOMATIDS**

Marcelo S. da Silva¹, Maria Alejandra Viviescas², Raphael Souza Pavani¹, Edna Gicela Ortiz², Camila B. Storti² and Maria Isabel N. Cano^{2*}

1Special Laboratory of Cell Cycle, Butantan Institute, São Paulo, Brazil; Center of Toxins, Immune Response and Cell Signaling-CeTICS, Butantan Institute, São Paulo, Brazil. 2Departament of Genetics, Biosciences Institute, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil

Abstract: Trypanosomatids are among the most primitive eukaryotes and therefore exhibit both conserved and unique non-conserved features in the DNA replication machinery. In eukaryotes, nuclear DNA replication is preceded by the assembly of the pre-replication complex (pre-RC), which is coordinated by the six-subunit origin recognition complex (ORC), which together with the Cdc6 and Cdt1 proteins play a central role in the loading of the hetero-hexameric Mcm2-7. In the domain Archaea there are no Cdt1 protein homologs, Mcm is a homo-hexameric complex, which is recruited by a protein that shows homology with ORC, and Cdc6 (called Orc/Cdc6). Curiously, trypanosomatid pre-RC differs from other eukaryotes in this context, and it appears more similar to that of Archaea, presenting a homolog of protein Orc/Cdc6 and no homologs of Cdt1, in addition to present Mcm as a hetero-hexameric complex. The completion of DNA replication, at trypanosomatid telomeres, apparently is similar to other eukaryotes, although the processing of the leading and lagging telomeres required to generate the 3' overhangs, which serves as telomerase substrate, remains unknown. With the generation of overhangs at the ends of the chromosomes, telomeres are frequently extended by the action of telomerase, whose control also remains unknown. It is worth mentioning that DNA replication in trypanosomatids initiates almost simultaneously in the nucleus and the kinetoplast, suggesting that regulation of DNA synthesis in the two DNA-containing organelles may be coordinated. The kinetoplast DNA (kDNA) consists of mini- and maxicircles, which are replicated by many proteins whose mechanisms of action remain unclear. This chapter aims to review and discuss the complex DNA replication mechanisms that act independently in the kinetoplast and the nucleus, as well as some fascinating peculiarities exclusive to the trypanosomatids protozoa group.

Keywords: Nuclear DNA replication, kinetoplast DNA replication, DNA polymerases, Origin Recognition Complex, Origin Licensing, Origin Firing, topoisomerases, replisome, replication forks, telomere replication.

*Corresponding Author: Maria Isabel N. Cano, Genetics Department - IB, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil; e-mail: micano@ibb.unesp.br

Apêndice 3

Estagio no exterior com bolsa BEPE da FAPESP

Universidade Estadual Paulista – Julio de Mesquita Filho– UNESP

Instituto de Biociência de Botucatu – IBB

Application of Single-telomere length analysis (STELA), Telo-PCR and RNA-FISH to
study *Leishmania* spp. telomere maintenance and transcription

Fellow: Edna Gicela Ortiz Morea

Supervisor: Maria Isabel Nogueira Cano

Relatório da Bolsa Estágio de
Pesquisa no Exterior para a
Fundação de Amparo à Pesquisa
do Estado de São Paulo

2018

Abstract

Telomeres are nucleoprotein structures that protect chromosome ends from fusion and degradation. Although generally considered transcriptionally silenced, it was recently demonstrated that telomeres from different eukaryotes are transcribed into long non-coding telomeric RNAs (lncRNA). In Kinetoplastida protozoa, including *Leishmania*, it was previously shown that different types of RNA polymerases transcribe telomeres. However, at that time, the transcription initiation site and the telomeric strand from which RNAs were transcribed were not clearly defined. TERRA (telomeric repeat-containing RNA) is an lncRNA transcribed from subtelomeric regions towards the 3' ends of telomeric repeats, whereby the C-rich telomeric strand is used as template. Several lines of evidence indicate that TERRA is essential to telomere maintenance, regulates telomere length, telomerase activity and heterochromatin deposition. Although TERRA biogenesis is well defined the functions associated to TERRA are still very controversial. We checked the expression of TERRA during the *Leishmania* developmental cycle using independent SL-Seq libraries constructed from the three parasite life stages (promastigotes, metacyclic and amastigotes). Northern blot and RT-PCR were used to validate the results and confirmed the existence of TERRA transcripts originating from *Leishmania* specific subtelomeric sequences followed by tracts of G-rich telomeric repeats of variable length. Putative mature polyadenylated TERRA transcripts originating from some, but not all, parasite chromosome ends (right and left arms) were identified, suggesting transcription regulation at *Leishmania* telomeres. The expression of TERRA in *Leishmania* further indicates that telomere transcription is highly conserved among eukaryotes. The aim of this project was to gain expertise in the techniques STELA, Telo-PCR and RNA-FISH, which will respectively be applied to the study of telomere length maintenance and telomere transcription in *Leishmania major*. We believe that the implementation of these techniques will help us to understand the role played by TERRA at *Leishmania major* telomeres and to study TERRA-associated functions in a pathogenic parasite.

1. Introduction

The genus *Leishmania* belongs to the order Kinetoplastida and is characterized by the presence of a special organelle that bears the mitochondrial DNA, named kinetoplast. This genus comprises dimorphic parasites, and among them are species that can cause leishmaniasis, a neglected disease transmitted by the bite of insects (*Phlebotomus*). Leishmaniasis is found in focal areas of more than 90 countries in the tropics, subtropics (GULL, 2001; JOHNSTON et al., 1999) and southern Europe (ANTINORI; SCHIFANELLA; CORBELLINO, 2012; PREVENTION, [s.d.]). Up to date, there are neither vaccine nor efficient or affordable treatments available for the different clinical manifestations of the disease. Currently, several undergoing studies are researching the physiology of the parasite aiming to discover new strategies that can lead to efficient treatment and prevention of leishmaniasis, providing drugs or methodologies that can efficiently fight the disease and are safe for the patient. Studies that contribute to the understanding of the biology and physiology of *Leishmania* ssp. and the identification of new functional sequences in parasite genome and transcriptome may provide a possibility of finding new therapeutic targets. One of the possible therapeutic targets would be found at the telomeric environment, due to their functionality on stabilizing the genome and their direct influence on cell proliferation (SEKARAN; SOARES; JARSTFER, 2014).

Telomeres are nucleoprotein structures formed by interacting proteins and non-coding repetitive DNA sequences located at the ends of chromosomes (BLACKBURN; GALL, 1978; PRYDE; GORHAM; LOUIS, 1997). Telomeric DNA is composed of DNA in double and single strands from which the G-rich one forms a protrusion towards the end of the chromosome, known as 3' G-overhang (BLACKBURN, 2005; CHAN; BLACKBURN, 2004; HENDERSON; BLACKBURN, 1989; WRIGHT et al., 1997). In humans, the double-strand telomeres usually associate with a protein complex named shelterin, which prevents telomeres from being recognized and processed as double-strand breaks (DE LANGE, 2005). Telomeres are present in eukaryotic cells and are responsible for protecting the chromosomes from degradation, recombination and fusion, ensuring that the genetic information is correctly copied during cell duplication. They are commonly associated with several biological important processes such as cell division control, aging, transcription regulation, genome integrity and maintenance of nuclear architecture (CHAN; BLACKBURN, 2004; DMITRIEV; PETROV; DONTSOVA, 2003). Until recently, it was believed that the telomeric sequences had an exclusive structural function. However, in some species of mammals and yeasts, it has now been

demonstrated that long noncoding RNAs (lncRNA) can originate from these regions(AZZALIN et al., 2007; SCHOEFTNER; BLASCO, 2008)(BAH et al., 2012; LUKE et al., 2008). In fission yeast, four different lncRNAs are transcribed from the ends of the chromosomes and have already been characterized: (i) TERRA, Telomeric Repeat containing RNA, is a non-coding RNA transcribed from the DNA C-rich telomeric strand containing subtelomeric and telomeric repeats. (ii) ARIA is a non-coding antisense RNA transcribed from the G-rich telomeric strand and, (iii) ARRET and (iv) α ARRET are non-coding RNAs transcribed from the subtelomeric region(BAH et al., 2012; GREENWOOD; COOPER, 2012).

The biogenesis and function of TERRA have been studied in different organism, unlike other members of the telomeric transcriptome that only have been described in fission yeast(BAH et al., 2012; GREENWOOD; COOPER, 2012). In mammals, TERRA molecules are composed of 5'UUAGGG 3' repeats ranging in size from 100bp to 9kb. They are also present in different eukaryotes, including rats, hamsters, zebrafish and yeasts, indicating that TERRA is evolutionarily conserved(AZZALIN et al., 2007; IGLESIAS et al., 2011; SCHOEFTNER; BLASCO, 2008). The C-rich telomeric strand serves as a template for the initiation of TERRA transcription from subtelomeric regions(NERGADZE et al., 2009; PFEIFFER et al., 2012). The main enzyme involved in TERRA synthesis is RNA polymerase II (RNAPII), as demonstrated in mammals(SCHOEFTNER; BLASCO, 2008) and subsequently in budding yeast(LUKE et al., 2008). In humans and *Saccharomyces cerevisiae*, the mature TERRA transcript carries a 7-methyl-guanosine at the 5' end. Additionally, all TERRA transcripts are polyadenylated in budding yeast, whereas in humans and fission yeast only a fraction of them are polyadenylated at the 3' ends(AZZALIN et al., 2007; BAH et al., 2012; LUKE et al., 2008; PORRO et al., 2010; SCHOEFTNER; BLASCO, 2008). TERRA transcripts are involved in regulation of telomere length and replication, being essential for the maintenance of telomeres, for the damage response at telomeres, and for regulation of telomeric chromatin composition(AZZALIN; LINGNER, 2015; MONTERO et al., 2016). It is still not well defined what regulates the number of TERRA transcripts. This is because their abundance is highly dependent on several factors, such as the cell cycle, the developmental stage of the cell, the telomere length, and also whether or not the cell is under stress conditions. In tumor cells, the number of TERRA transcripts also depends on the tumor developmental stage(ARORA; BRUN; AZZALIN, 2011).

We have recently identified TERRA in *Leishmania major* (*L. major*) by analyzing results of SL-Seq using bioinformatic approaches. The *in silico* search was based on the features associated to TERRA loci in other organisms, since they present conserved features in mammals and yeasts, which facilitates the use of computational tools for their identification. The SL-Seq analysis results were subsequently confirmed experimentally using RT-PCR and northern blot analyses (see Preliminary results).

This proposal aimed to provide the fellow with training and expertise on methods such as STELA, Telo-PCR and RNA-FISH, which will later be applied, to *L. major* in order to investigate telomere length maintenance and telomere transcription. We believe that the use of these methods will help us understand the role played by TERRA at *L. major* telomeres and to study TERRA-associated functions in a pathogenic parasite. This will be the first work showing the characterization of telomeric lncRNAs in *Leishmania*.

2. Project goals

- 2.1. To receive training and gain expertise on assessing telomeres length at individual chromosomes using the Single TELOmere Length Analysis (STELA).
- 2.2. To receive training and gain expertise on measuring the length of individual telomeres using Telo-PCR, which is a method that encompasses PCR amplification, cloning and sequencing.
- 2.3. To receive training and gain expertise on RNA Fluorescence *in situ* Hybridization (RNA-FISH) in order to investigate TERRA transcription and localization at the subcellular level.

3. Chronogram and proposed activities

Activities	October	November	December
STELA	√		
RNA Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization (FISH)		√	
Telo-PCR		√	√

4. Methods

4.1. Conditions of cell growth

Human cells

Two different cells line were used in this project. The U2-OS osteosarcoma cells that presents Alternative Lengthening of Telomeres (ALT), and a telomerase-positive cell line, HEK293 embryonic kidney cells. All cell lines were cultivated at 37°C using high glucose D-MEM medium (Life Technologies).

Leishmania infantum

Leishmania infantum promastigotes were kindly donated by Dr. Lenea Campino from Instituto de Medicina Tropical de Lisboa. Parasites were cultivated at 28°C using RPMI medium with bicarbonate and L-glutamine (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% of fetal bovine serum and 50 units/mL of penicillin and 50 µg/mL of streptomycin (Sigma-Aldrich).

4.2. STELA

Human cells

Genomic DNA from U2-OS and from HEK293 cells was isolated via conventional phenol/chloroform method. The DNA was digested with *EcoRI* (New England Biolabs) (for XpYp subtelomeres). 100 ng of digested genomic DNA was mixed with 1 µl of Telorette linker (10 µM) (Table 1). Incubated at 60°C for 10 min and then cooled to room temperature (RT) (10-15 min). Subsequently, 0.1 µl ATP (100 mM), 0.1 µl T4 DNA Ligase (400 U/µl), 1 µl 10X Ligase buffer were added to the mixture, incubated at 35°C for 12h and then at 70°C for 15 min. Later a PCR reaction was performed using specific primers for XpYp subtelomeres (Table 1). The PCR products were run onto a 0.8% agarose gel overnight. The gel was dried at 50°C and rinsed in 2X SSC, following steps of denaturation (30 min) and neutralization (30 min). The sample was pre-hybridized and hybridized with telomeric probes.

Leishmania major

Genomic DNA from *Leishmania major* was isolated using the rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa²⁶. The DNA was digested with *NheI* (New England Biolabs). 100 ng of digested genomic DNA was mixed with 1 µl of Telorette linker (10 µM) (Table 1). Incubated at 60°C for 10 min and then cooled to RT (10-15 min). Subsequently, 0.1 µl ATP (100 mM), 0.1 µl T4 DNA Ligase (400 U/µl), 1 µl 10X Ligase buffer were added to the mixture incubated at 35°C for 12h and then at 70°C for 15 min.

Later a PCR reaction was performed using specific primers for subtelomeric region from chromosome 03 and 24 right arm (Table 1). The PCR products were run onto a 0.8% agarose gel overnight. The gel was dried at 50°C and rinsed in 2X SCC, following steps of denaturation (30 min) and neutralization (30 min). The sample was pre-hybridized and hybridized with telomeric probes (CCCTAA)₅.

Table 1. Oligonucleotids used in this work

Organism	Name	Sequence 5'-3'	Technique
Human cell	Teltail	TGCTCCGTGCATCTGGCATC	STELA
Human cell	XpYpE2 (G)	GTTGTCTCAGGGTCCTAGTG	STELA
Human cell	Telorette1	TGCTCCGTGCATCTGGCATCCCCTAAC	STELA
Human cell	Telorette2	TGCTCCGTGCATCTGGCATCTAACCCCT	STELA
Human cell	Telorette3	TGCTCCGTGCATCTGGCATCCCCTAACC	STELA
Human cell	Telorette4	TGCTCCGTGCATCTGGCATCCTAACCC	STELA
Human cell	Telorette5	TGCTCCGTGCATCTGGCATCAACCCTA	STELA
Human cell	Telorette6	TGCTCCGTGCATCTGGCATCACCCCTAA	STELA
Yeast	Sp 494-FOR	TGAGTGTGCTGGAGTACGTT	Telo-PCR
<i>Leishmania</i>	SubChr.03- L-F	TCTTCGCAGCCTTACTGGAT	Telo-PCR e STEI
<i>Leishmania</i>	SubChr.24- R- F	GCAGCGAAGAGGATCAGACT	Telo-PCR e STEI
Yeast and <i>Leishmania</i>	dG18- BamHI	CGGGATCCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	Telo-PCR
Yeast and <i>Leishmania</i>	Oligo dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Telo-PCR

4.3. Telo-PCR of fission yeast telomeres

Genomic DNA was isolated according to “Genomic DNA Isolation From Fission Yeast Cells: Glass Beads Protocol”²⁷. Around 150 ng of DNA was denatured by the addition of 8 µL of OPA 1X buffer and 5 min at 96°C boiling followed by rapidly cooling at 4°C. To tail the 3'-OH ends 1µL of tailing mix (1U TdT, 1X OPA, 1mM dCTP) was added to 9µL of the previous reaction and incubated for 30 min at 37 °C, the enzyme was

heat-inactivated at 65°C for 10 min and the mixture was denatured at 94°C for 5 min. After incubation, it is important to immediately proceed with the PCR reaction (65°C for 20 sec for annealing) using specific primers (Table 1).

4.4. RNA FISH

RNA-FISH for human cells

RNA-FISH allows the detection of RNA molecules on fixed cells. Cell preparation. Adherent cells were grown directly on glass microscope slides for at least 14 hours. Cells in the suspension were spun onto glass slides. Cells were permeabilized with Triton X-100 0,5% and fixed in freshly made 4% Paraformaldehyde/1X PBS (pH 7) for 10 minutes at RT, followed by repermeabilization step and several washes in 1X PBS. Cells were dehydrate through an ethanol series (70%, 90%, 100%) for 5 minutes at RT, then the slides were air-dried. Probe labeling. To prepare a Telomeric DNA probe containing cy3-dCTP, RadPrime DNA labeling system from Invitrogen was used, the cy3-dCTP is from Perkin-Elmer. The DNA probe was denatured at 80°C for 5 min and quickly passed on the ice. Hybridization step. 10 µl of probe mix were pipetted on the slide, a coverslip was placed over the probe and sealed with rubber cement. The sample was incubated at 37°C overnight in a light protected humidified chamber. The slides were washed in 2X SSC, DNA was counterstained with DAPI/2X SSC for 5 min. at RT, the slides were rinsed with 2X SSC. Coverslips were mounted on slides and sealed. Images were captured using a fluorescence microscope Zeiss Axiovert 200M, magnification 63X. And the ZEISS ZEN Microscope Software (blue edition).

RNA-FISH for *Leishmania*

Cell preparation. For this assay, we used 1×10^6 parasites in the promastigote form. Cells were washed to eliminate the culture medium and the assay was performed using three different protocols for cell preparation: 1) Cells were permeabilized with Triton X-100 0,5% before and after the fixing step. 2) Cells were permeabilized with Triton X-100 1% after the fixing step. 3) No permeabilization was used. After the entire permeabilization step, the following steps are as described for human RNA-FISH.

5. Results and discussion

5.1. STELA

The Single telomere length analysis (STELA) technique allows to measure specific individual telomere lengths²⁸. This procedure allows for the detection of short and long telomeres, regardless of its chromosomal location. The training in STELA techniques involved performing STELA using HEK and U2-OS cell lines. This protocol was previously established and the results are well known. For this assay, we used the six combinations of Telorette linker (Table 1) (Fig. 1). The STELA profile for both cell lines results in apparition of several bands, which represent different telomere sizes. The difference among the band weight (telomere size) corresponds to the heterogeneity in heritable telomere length between individual telomeres^{29,30}. In this case, the telomere size that is considered is the most intense band, which represents the telomere size of the majority of cells analyzed as shown in Fig 1.

We tried to standardize STELA to estimate the size of *Leishmania major* telomeres using chromosome 03 and chromosome 24 right arms sequence which present unique subtelomeric sequences (Attachment 1). We made this choice because it was very hard to find unique subtelomeric ends of individual chromosomes due to the huge sequence similarity shared between different parasite chromosome ends. We performed STELA using the six combinations of Telorette linker (Table 1) used to analyze human telomeres because the *Leishmania* spp. telomeric repeat is identical to humans (5'-TTAGGG-3')^{31,32}. Different to the human STELA profile which generates bands of different size and intensity. *Leishmania* STELA resulted in a smear profile. Curiously, a similar smear appeared in the ethidium bromide stained agarose gel. Usually, when STELA is used to estimate telomere size from other organisms it is not possible to visualize any results in the agarose gels; they appear only after hybridization. Thus, it is possible that, the smear shown on Fig. 2 is the result of too much template or the amplification of incomplete amplicons, which probably served as primers and amplified technical artifacts (Fig.2). As shown before one critical condition when standardizing STELA is the amount of template added, since this technique is very sensitive³³. Back into Brazil we are now standardizing STELA protocol for *Leishmania* trying first to change some protocol steps and the amount of the initial template.

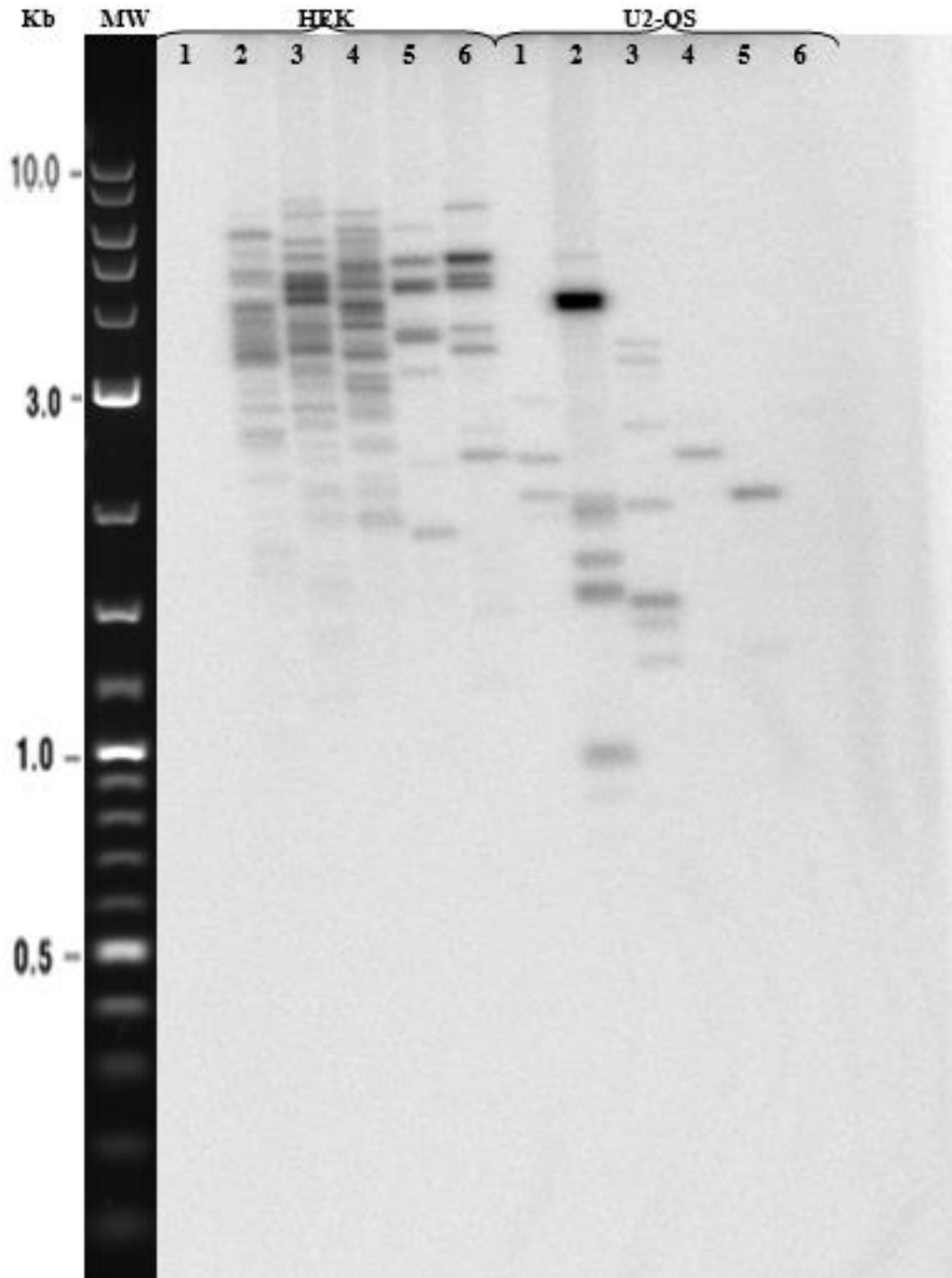


Figure 1. STELA from HEK and U2-OS genomic DNA. Genomic DNA was ligated with each telorette and amplified using primers teltail and XpYpE2. Line 1: telorette1, line 2: telorette2, line 3: telorette3, line 4: telorette4, line 5: telorette5 and line 6: telorette6. MW is the molecular marker 2-Log DNA ladder (New England biolabs). The blot was hybridized with the telomeric probe.

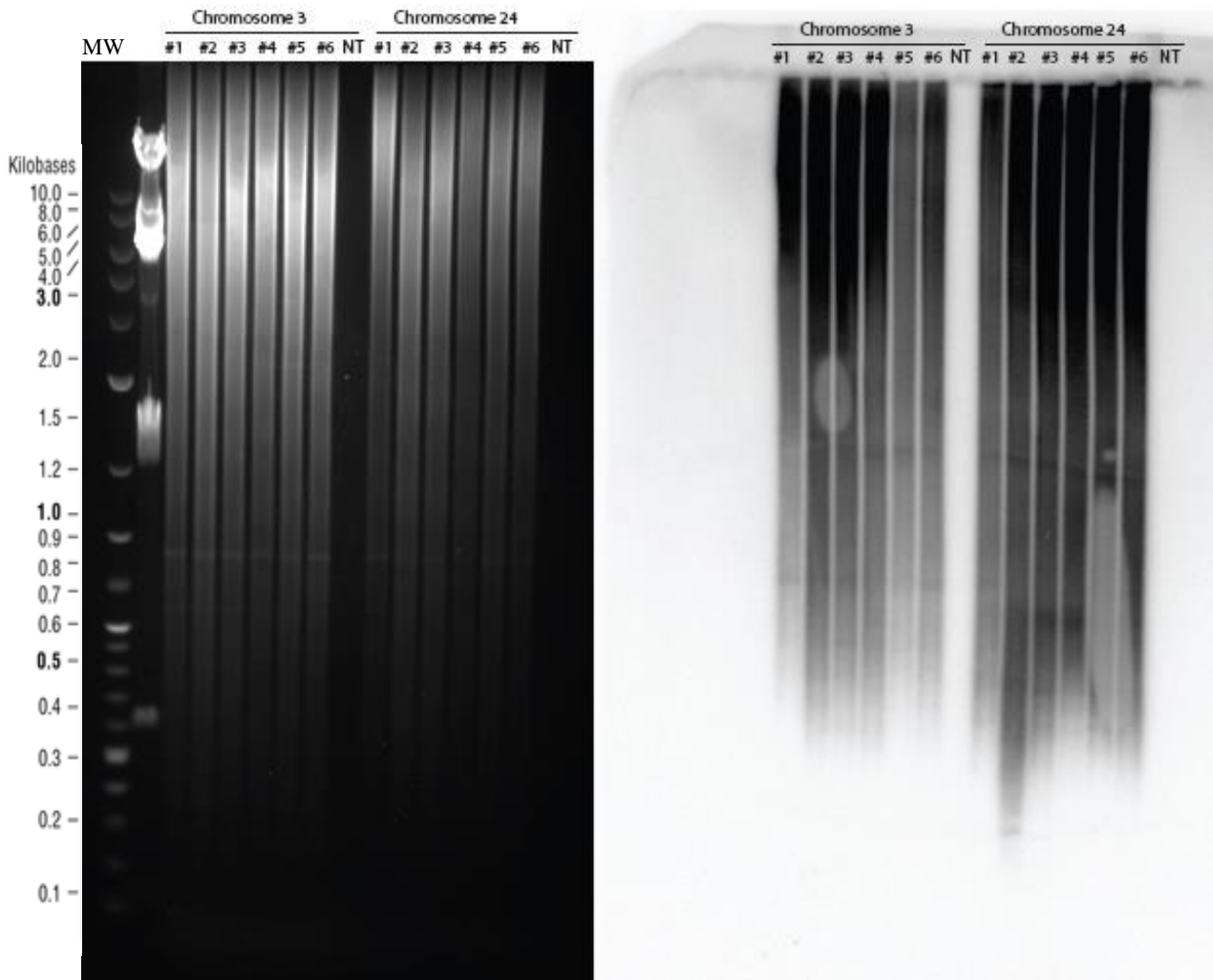


Figure 2. STELA from *Leishmania major* genomic DNA. Genomic DNA was ligated with each telorette and amplified with primer teltail and Chr03 and Chr24. Line 1: telorette1, line 2: telorette2, line 3: telorette3, line 4: telorette4, line 5: telorette5 and line 6: telorette6. MW 2-Log DNA ladder (New England Biolabs), is the marker lane showing the molecular weight of the bands. The blot was hybridized to the telomeric probe. It shows agarose gel (Left) and blot (right).

5.2. Telo PCR

Telo PCR is a technique used to measure the size of individual telomeres, and it is very precise to estimate the size of telomeres about 1Kb such as the yeast telomeres³⁴. Since *Leishmania* telomeres are not long (about 2 kb in length)³² when compared with human telomeres (about 10Kb), Telo-PCR would work to measure the size of individual parasite telomeres. To learn the method we first performed Telo-PCR using wild type and *Schizosaccharomyces pombe rif1* strain. Rif1 is a regulator of telomere length³⁵ and as expected, *rif1* strain presents longer telomeres (~1.2kb) than the wild-type strain (1.0 kb)³⁶, as shown in Fig. 3. Since we succeeded with *S. pombe* Telo-PCR, the next step was

to try a similar protocol using *Leishmania major* DNA obtained from promastigote forms. To reach this goal we first increased the extension time in the PCR reaction (72°C for 1 min), because *Leishmania* telomeres are longer than *S. pombe* telomeres. We also included different controls (Fig. 4). Our first attempt using only primer Dg18 did not succeed because the amplified products were similar to the products generated with the combination of primers Dg18 and Chr03 and Dg18 and Chr24 without the tailing step. According to the standard method reactions without the tailing step there is no product amplification. Thus, what we are seeing in the gel is probably primer dimer amplification. To increase the assay specificity we increased the annealing temperature to 72°C (Fig. 5), which still resulted in primer dimer amplification. Thus, we decided to change the nucleotides in the tailing reaction because apparently the problem was the Dg18 primer. Since *Leishmania* genome is GC rich, when we use the Dg18 primer we probably decrease the specificity of the primer.

Telo-PCR was then performed using dATP for tailing and the reverse primer was oligo dT, using the specific forward primers for chromosome 03 and 24 right arms from *L. major*. The PCR was performed with annealing temperatures of 72 °C and 55°C, and dATP for taling from yeast was used as control. As shown in Fig. 6, it was not possible to detect any products using 72°C as the annealing temperature either for *Leishmania* or for yeast. However, using 55°C as the annealing temperature we can see a smear in both cases (Fig.6). In yeast, the same smear pattern was presented with and without tailing, so, apparently it did not work (Fig. 6D). In *Leishmania* the smear presented with and without tailing is different but it seems that we did not get the ideal conditions to reach our goal (Fig. 6C).

The next step is to change the annealing temperature between 58°C to 65°C, or to perform Telo-PCR using an anchor primer to the 3' end of the telomere³⁷ which would increase the assay specificity.

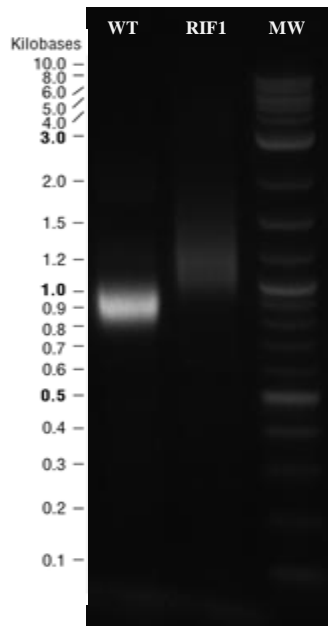


Figure 3. Telo-PCR from yeast wild type and *rif1* using polyC tailing. Ethidium bromide 1% agarose gel. MW is the molecular weight marker 2-Log DNA ladder (New England Biolabs). PCR reaction was performed using 65°C as the annealing temperature.

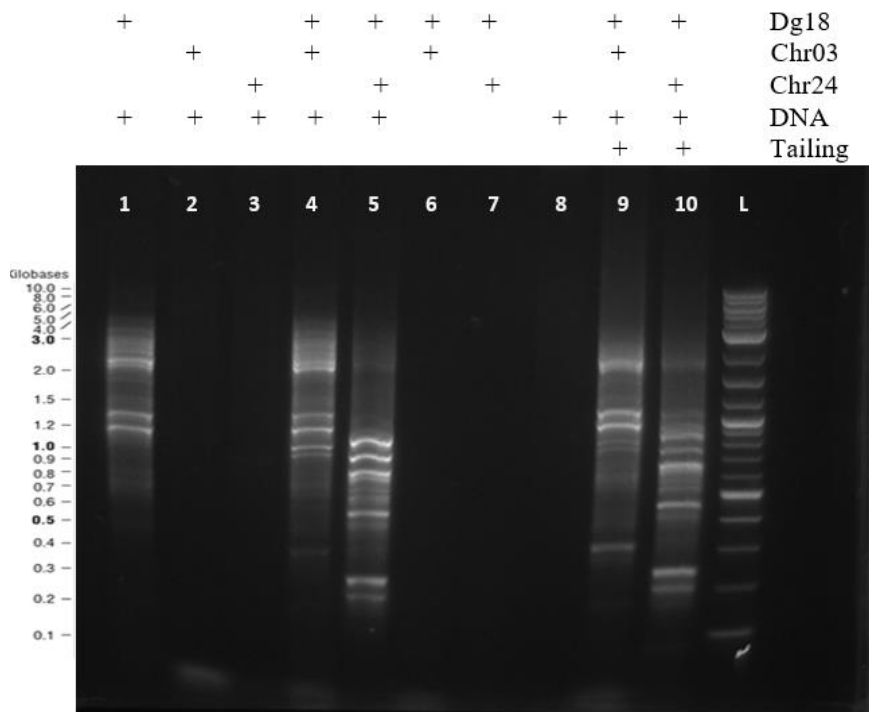


Figure 4. Telo-PCR from *Leishmania major* using polyC tailing. Ethidium bromide 1% agarose gel. MW is the molecular weight marker 2-log DNA ladder (New England Biolabs). Presence of primers, DNA and tailing is marked by +. PCR reaction was performed using 65°C as the annealing temperature.

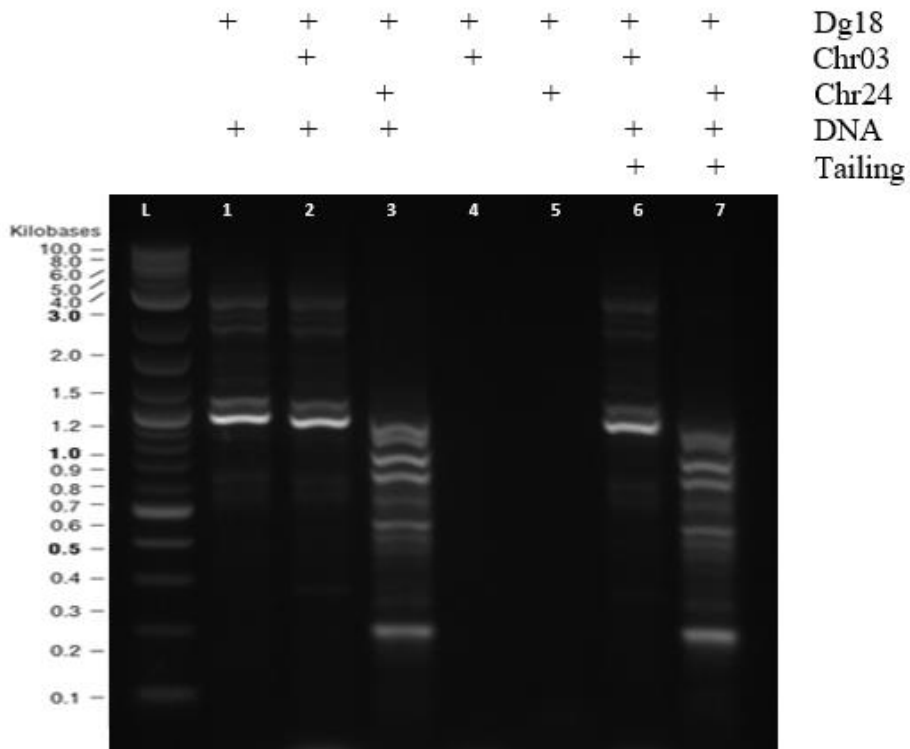


Figure 5. Telo-PCR from *Leishmania major* using polyC tailing. Ethidium bromide 1% agarose gel. MW is the molecular weight marker 2-log DNA ladder (New England Biolabs). Presence of primers, DNA and tailing is marked by +. PCR reaction was performed using 72°C as the annealing temperature

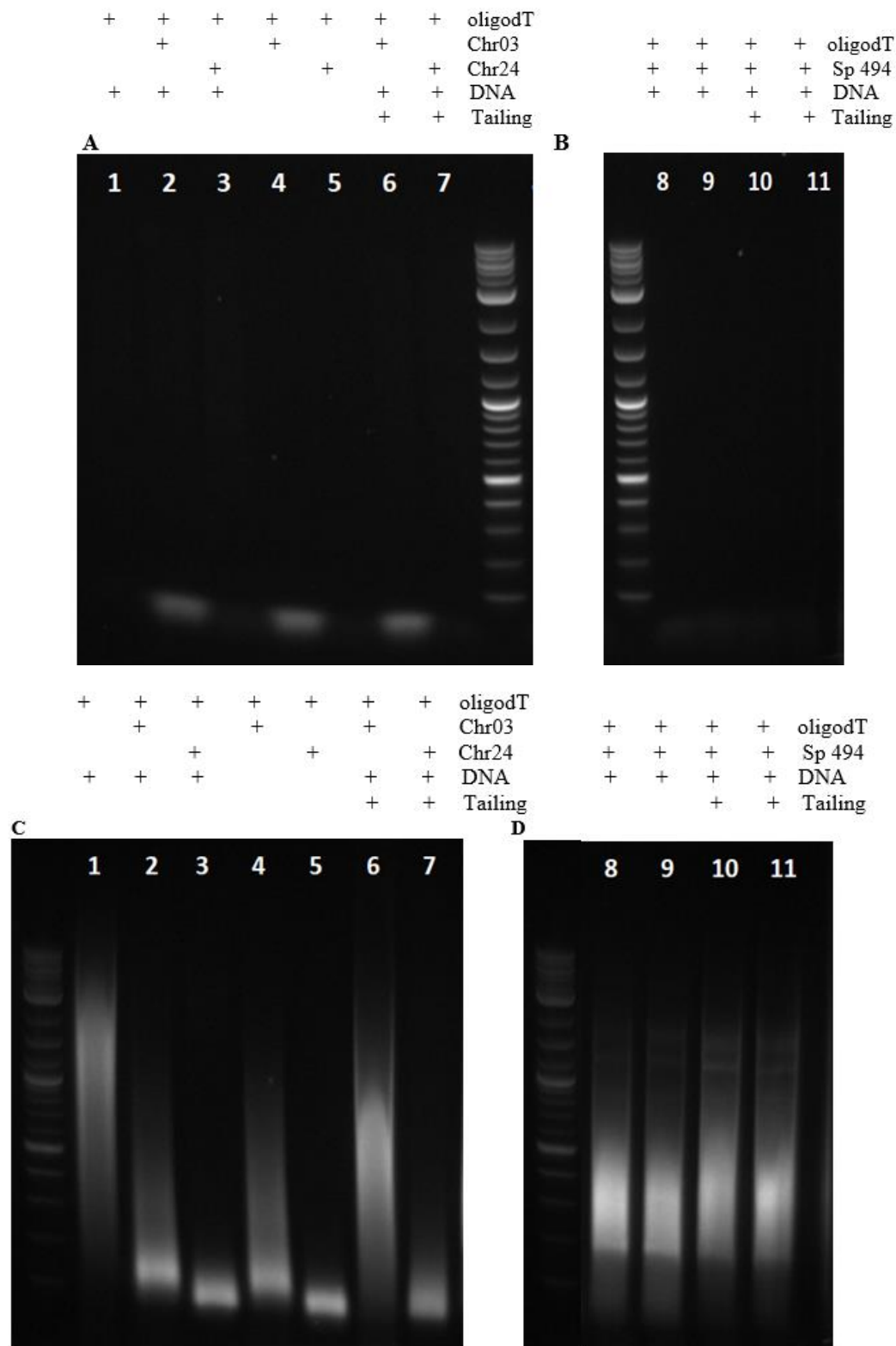


Figure 6. Telo-PCR from *Leishmania major* and yeast using polyA tailing. Ethidium bromide 1% agarose gel. MW is the molecular weight marker 2-log DNA ladder (New England Biolabs). Presence of primers, DNA and tailing is marked by +. **A and C)** *Leishmania major* genomic DNA. **B and D)** yeast genomic DNA. **A and B)** PCR reaction was performed using 72°C as the annealing temperature. **C and D)** PCR reaction was performed using 55°C as the annealing temperature.

5.3.RNA FISH

RNA-FISH is a method used to visualize the intranuclear distribution of TERRA. The RNA-FISH shown in Fig. 7 was performed using U2-OS cells, and a specific TERRA probe. As shown, in U2-OS cells TERRA is present in nuclear foci. In addition, when cells were pre-treated with RNase A just a low signal is detected, which corresponds to the telomere 3'G- overhangs (Fig. 7).

To standardize RNA-FISH to detect *Leishmania* TERRA, we performed three different experiments: 1) Using the same RNA-FISH protocol used for human cells (permeabilization before and after fixing the cells), 2) Using the RNA-FISH protocol used for human cells but with the permeabilization step after fixing cell and 3) Using the RNA-FISH protocol used for human cells without the permeabilization step. The changes in the permeabilization steps were carried out taking into account the size of *Leishmania* cells which are much smaller (about 20 μm) than human cells. RNA-FISH was performed with *Leishmania infantum* promastigotes, kindly provided by Lenea Maria Campino, and grown in the laboratory of Dr. Luisa Figueiredo. As shown in Fig 7, it was possible to detected fluorescence signals corresponding to TERRA using the three protocols, since any signals were detected when cells were pre-treated with RNase A, suggesting that the fluorescence signal actually corresponds to TERRA RNA. It was also possible to see that the best protocol was protocol 2, using permeabilization step after the fixing step, because with this protocol more cells showed the hybridization signal corresponding to TERRA (Fig. 8). The signal detected was distributed approximately in two foci per cell, although we expected to detect a larger number of foci as shown in human cells, since we detected TERRA expression from a larger number of *Leishmania* telomeres (Morea, Azzalin & Cano, unpublished data). As the other methodologies shown here, we intend to repeat and refine the RNA-FISH protocol to confirm these results.

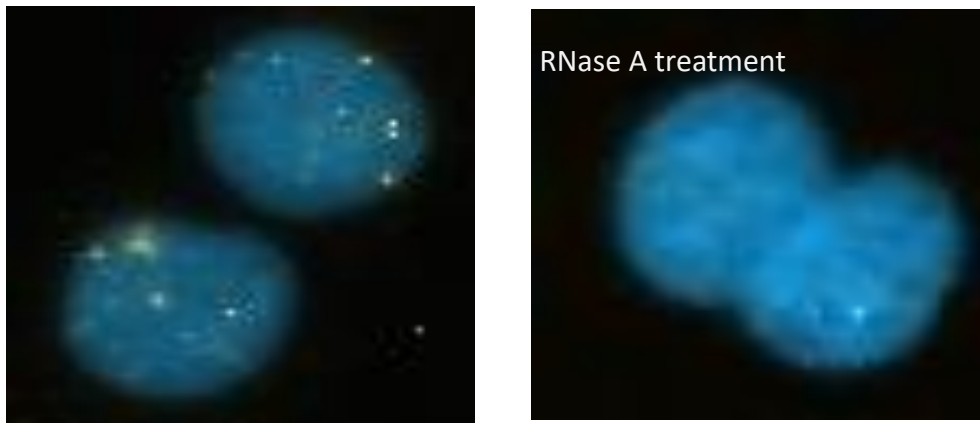


Figure 7. Identification of TERRA by RNA-FISH in U2-OS cells. For the FISH hybridization we used random priming with Cy3-dCTP, dTTP and dATP (Perkin Elmer). Images were captured using Zeiss Axiovert 200M, magnification 63X and the ZEISS ZEN Microscope Software (blue edition). As control, U2-OS cells were pre-treated with RNase A.

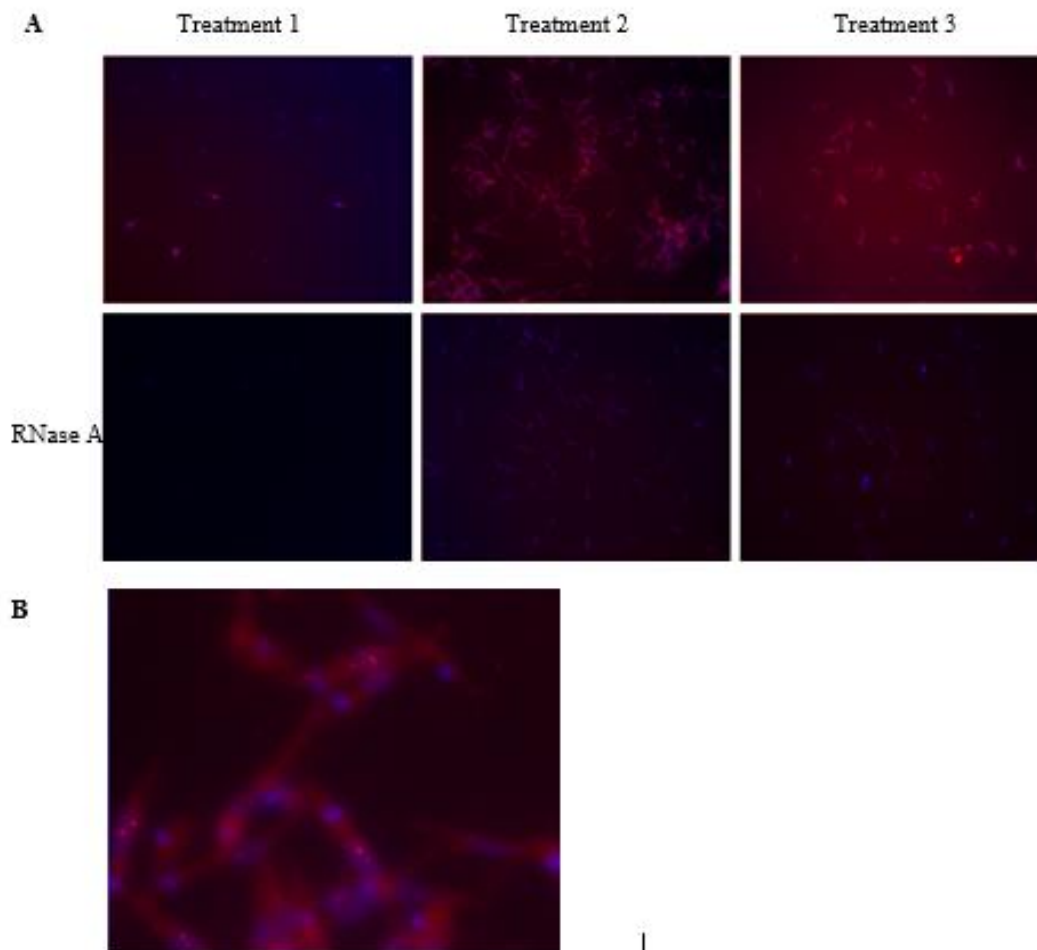


Figure 7. Identification of TERRA by RNA-FISH in *Leishmania infantum* promastigotes. Hybridization with random priming with Cy3-dCTP, dTTP and dATP (Perkin Elmer). **A)** Protocols: 1) Permeabilization before and after fixing the cells, 2) Permeabilization after fixing the cells and 3) Without any permeabilization step. As control *L. infantum* promastigotes were pre-treated with RNase A. **B)** Enlarged image. Images were captured using Zeiss Axiovert 200M, magnification 63X and the ZEISS ZEN Microscope Software (blue edition).

6. Additional data

During the two months that I spent in Professor Claus's laboratory, I had the opportunity of learn STELA, Telo-PCR and RNA-FISH methods, which will be further applied in Dr. Cano's lab in Brazil in order to investigate telomere maintenance and transcription in *Leishmania*. Dr. Azzalin has a great expertise in these methodologies applied to the study of telomeres and TERRA in humans and yeast. Thus, in order to apply these methodologies to study *Leishmania* telomeres, we could also establish fruitful collaborations with two other groups in Lisbon, Dr. Lenea Campino from the Instituto de Medicina Tropical who allowed me to extract DNA from *Leishmania major* which was used to standardize STELA and Telo-PCR and who donated the *Leishmania infantum* used to develop the RNA-FISH assays. And Dr. Luisa Figueiredo from Instituto de Medicina Molecular, who gave me all the biosafety conditions to manipulate *Leishmania infantum* cultures in her laboratory.

7. Bibliography

- AGAMI, R.; SHAPIRA, M. Nucleotide sequence of the spliced leader RNA gene from *Leishmania mexicana amazonensis*. **Nucleic acids research**, v. 20, n. 7, p. 1804, 11 abr. 1992.
- ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 2, p. 109–118, 1 fev. 2012.
- ARORA, R. et al. RNaseH1 regulates TERRA-telomeric DNA hybrids and telomere maintenance in ALT tumour cells. **Nature communications**, v. 5, p. 5220, 21 out. 2014.
- ARORA, R.; AZZALIN, C. M. Telomere elongation chooses TERRA ALternatives. **RNA Biology**, v. 12, n. 9, p. 938–941, 2 set. 2015.
- ARORA, R.; BRUN, C. M. C.; AZZALIN, C. M. TERRA: Long Noncoding RNA at Eukaryotic Telomeres. In: [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 65–94.
- AUTEXIER, C.; LUE, N. F. The Structure and Function of Telomerase Reverse Transcriptase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 493–517, jun. 2006.
- AZZALIN, C. M. et al. Telomeric Repeat Containing RNA and RNA Surveillance Factors at Mammalian Chromosome Ends. **Science**, v. 318, n. 5851, p. 798–801, 2 nov. 2007.
- AZZALIN, C. M.; LINGNER, J. Telomere functions grounding on TERRA firma. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 1, p. 29–36, jan. 2015.
- BAH, A. et al. The telomeric transcriptome of *Schizosaccharomyces pombe*. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 7, p. 2995–3005, abr. 2012.
- BAHLER, J. et al. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. **Yeast**, v. 14, n. 10, p. 943–951, jul. 1998.
- BALK, B. et al. Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence. **Nature structural & molecular biology**, v. 20, n. 10, p. 1199–205, 8 out. 2013.
- BARBIÉRI, C. L.; DOINE, A. I.; FREYMULLER, E. Lysosomal depletion in macrophages from spleen and foot lesions of *Leishmania*-infected hamster. **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 2, p. 218–228, ago. 1990.
- BARRETT, M. P. et al. The trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1469–1480, 1 nov. 2003.
- BAUR, J. A. et al. Telomere Position Effect in Human Cells. **Science**, v. 292, n. 5524, p. 2075–2077, 15 jun. 2001.
- BEATTIE, T. L. et al. Reconstitution of human telomerase activity in vitro. **Current biology** :

CB, v. 8, n. 3, p. 177–80, 29 jan. 1998.

BERMAN, J. Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Current infectious disease reports**, v. 7, n. 1, p. 33–38, jan. 2005.

BESTEIRO, S. et al. Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 16, p. 11384–96, 21 abr. 2006.

BLACKBURN, E. H. Telomeres and their synthesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 249, n. 4968, p. 489–90, 3 ago. 1990.

BLACKBURN, E. H. Cell biology: Shaggy mouse tales. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 922–923, 18 ago. 2005.

BLACKBURN, E. H.; COLLINS, K. Telomerase: an RNP enzyme synthesizes DNA. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 5, 1 maio 2011.

BLACKBURN, E. H.; GALL, J. G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. **Journal of molecular biology**, v. 120, n. 1, p. 33–53, 25 mar. 1978.

BLASCO, M. A. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 4, p. 299–309, abr. 2007.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 15 ago. 2017.

BORST, P. Discontinuous Transcription and Antigenic Variation in Trypanosomes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 701–732, jun. 1986.

BOSOY, D. et al. Conserved N-terminal motifs of telomerase reverse transcriptase required for ribonucleoprotein assembly in vivo. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 6, p. 3882–90, 7 fev. 2003.

BRAULT, M.; D'SOUZA, Y.; AUTEXIER, C. Telomerase: evolution, structure and function. In: **Origin and Evolution of Telomeres**. [s.l: s.n.]. p. 1–17.

CANO, M. I. et al. Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 7, p. 3616–21, 30 mar. 1999.

CHAN, S. R. W. L.; BLACKBURN, E. H. Telomeres and telomerase. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1441, p. 109–122, 29 jan. 2004.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. S7–S16, nov. 2007.

CHEN, J.-L.; GREIDER, C. W. An emerging consensus for telomerase RNA structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 41, p. 14683–4, 12 out. 2004.

CHEN, J. L.; BLASCO, M. A.; GREIDER, C. W. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. **Cell**, v. 100, n. 5, p. 503–14, 3 mar. 2000.

CHEN, Y. et al. A Shared Docking Motif in TRF1 and TRF2 Used for Differential Recruitment of Telomeric Proteins. **Science**, v. 319, n. 5866, p. 1092–1096, 22 fev. 2008.

CHIANG, Y. J. et al. Expression of telomerase RNA template, but not telomerase reverse transcriptase, is limiting for telomere length maintenance in vivo. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 16, p. 7024–31, ago. 2004.

CHIURILLO, M. A. et al. Organization of telomeric and sub-telomeric regions of chromosomes from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 173–183, 25 maio 1999.

CHU, H. P. et al. TERRA RNA Antagonizes ATRX and Protects Telomeres. **Cell**, v. 170, n. 1, p. 86–101.e16, 2017.

COLLINS, K.; GANDHI, L. The reverse transcriptase component of the *Tetrahymena* telomerase ribonucleoprotein complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 15, p. 8485–90, 21 jul. 1998.

CONTE, F. F.; CANO, M. I. N. Genomic organization of telomeric and subtelomeric sequences of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 13, p. 1435–1443, nov. 2005.

CpG Islands. Disponível em: <http://www.bioinformatics.org/sms2/cpg_islands.html>. Acesso em: 15 ago. 2017.

CRISPR gRNA (guide RNA) Design Tool for Eukaryotic Pathogens. Disponível em: <<http://grna.ctegd.uga.edu/>>. Acesso em: 18 ago. 2017.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 111–26, jan. 2006.

CUSANELLI, E.; CHARTRAND, P. Telomeric repeat-containing RNA TERRA: a noncoding

- RNA connecting telomere biology to genome integrity. **Frontiers in genetics**, v. 6, p. 143, 2015.
- CUSANELLI, E.; ROMERO, C. A. P.; CHARTRAND, P. Telomeric Noncoding RNA TERRA Is Induced by Telomere Shortening to Nucleate Telomerase Molecules at Short Telomeres. **Molecular Cell**, v. 51, n. 6, p. 780–791, 26 set. 2013.
- CUYPERS, B. et al. Multiplexed Spliced-Leader Sequencing: A high-throughput, selective method for RNA-seq in Trypanosomatids. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3725, 16 dez. 2017.
- DA SILVA, M. S. et al. In: DNA Replication and Mutation Nuclear DNA Replication in Trypanosomatid Protozoa. [s.d.].
- DA SILVA, R.; SACKS, D. L. Metacyclogenesis is a major determinant of Leishmania promastigote virulence and attenuation. **Infection and immunity**, v. 55, n. 11, p. 2802–6, nov. 1987.
- DAS, S. et al. Unmethylated CpG motifs in the *L. donovani* DNA regulate TLR9-dependent delay of programmed cell death in macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 97, n. 2, p. 363–378, 1 fev. 2015.
- DE LANGE, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. **Genes & Development**, v. 19, n. 18, p. 2100–2110, 15 set. 2005.
- DILLON, L. A. L. et al. Transcriptomic profiling of gene expression and RNA processing during *Leishmania major* differentiation. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 14, p. 6799–813, 18 ago. 2015.
- DMITRIEV, P. V.; PETROV, A. V.; DONTSOVA, O. A. Yeast Telosome Complex: Components and Their Functions. **Biochemistry (Moscow)**, v. 68, n. 7, p. 718–734, 2003.
- ECKHARDT, F. et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. **Nature Genetics**, v. 38, n. 12, p. 1378–1385, 29 dez. 2006.
- ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 4, p. 286–298, 6 abr. 2007.
- FARNUNG, B. O.; GIULOTTO, E.; AZZALIN, C. M. Promoting transcription of chromosome ends. **Transcription**, v. 1, n. 3, p. 140–143, nov. 2010.
- FLYNN, R. L. et al. Alternative lengthening of telomeres renders cancer cells hypersensitive to ATR inhibitors. **Science**, v. 347, n. 6219, p. 273–277, 16 jan. 2015.
- FROMMER, M. et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 5, p. 1827–31, 1 mar. 1992.
- FU, G.; BARKER, D. C. Rapid cloning of telomere-associated sequence using primer-tagged amplification. **BioTechniques**, v. 24, n. 3, p. 386–90, mar. 1998.
- FU, G.; PERONA-WRIGHT, G.; BARKER, D. C. *Leishmania braziliensis*: Characterisation of a Complex Specific Subtelomeric Repeat Sequence and Its Use in the Detection of Parasites. **Experimental Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 236–243, nov. 1998.
- GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. **Journal of molecular biology**, v. 196, n. 2, p. 261–82, 20 jul. 1987.
- GIARDINI, M. A. et al. *Leishmania amazonensis*: Partial purification and study of the biochemical properties of the telomerase reverse transcriptase activity from promastigote-stage. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 243–248, jan. 2011.
- GIARDINI, M. A. et al. Telomere and Telomerase Biology. In: **Progress in molecular biology and translational science**. [s.l.: s.n.]. v. 125p. 1–40.
- GILSON, E.; GÉLI, V. How telomeres are replicated. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 825–838, out. 2007.
- GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International journal for parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027–34, 15 set. 2003.
- GOTTSCHLING, D. E. et al. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. **Cell**, v. 63, n. 4, p. 751–62, 16 nov. 1990.
- GRAF, M. et al. Telomere Length Determines TERRA and R-Loop Regulation through the Cell Cycle. **Cell**, v. 170, n. 1, p. 72–85.e14, 2017.
- GREENWOOD, J.; COOPER, J. P. Non-coding telomeric and subtelomeric transcripts are differentially regulated by telomeric and heterochromatin assembly factors in fission yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 7, p. 2956–2963, abr. 2012.
- GREIDER, C. W. Telomere Length Regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 337–365, jun. 1996.
- GUEVARA, P. et al. Green fluorescent protein-tagged *Leishmania* in phlebotomine sand flies. **Journal of medical entomology**, v. 38, n. 1, p. 39–43, jan. 2001.
- GULL, K. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 443–52, 1 maio 2001.

- GUPTA, C. L. et al. Cross talk between *Leishmania donovani* CpG DNA and Toll-like receptor 9: An immunoinformatics approach. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 459, n. 3, p. 424–429, 10 abr. 2015.
- GUPTA, S. K. et al. The *Trypanosoma brucei* telomerase RNA (TER) homologue binds core proteins of the C/D snoRNA family. **FEBS Letters**, v. 587, n. 9, p. 1399–1404, 2 maio 2013.
- HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 569–577, dez. 2007.
- HENDERSON, E. R.; BLACKBURN, E. H. An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. **Molecular and cellular biology**, v. 9, n. 1, p. 345–8, jan. 1989.
- Home - NEB | New England Biolabs**. Disponível em: <<https://international.neb.com/>>. Acesso em: 18 ago. 2017.
- HUG, N.; LINGNER, J. Telomere length homeostasis. **Chromosoma**, v. 115, n. 6, p. 413–425, 27 out. 2006.
- IGLESIAS, N. et al. Subtelomeric repetitive elements determine TERRA regulation by Rap1/Rif and Rap1/Sir complexes in yeast. **EMBO reports**, v. 12, n. 6, p. 587–593, 28 jun. 2011.
- INBAR, E. et al. The Transcriptome of *Leishmania major* Developmental Stages in Their Natural Sand Fly Vector. **mBio**, v. 8, n. 2, p. e00029-17, 3 maio 2017.
- JOHNSTON, D. A. et al. Genomics and the biology of parasites. **BioEssays**, v. 21, n. 2, p. 131–147, 12 fev. 1999.
- KAPLER, G. M.; COBURN, C. M.; BEVERLEY, S. M. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. **Molecular and cellular biology**, v. 10, n. 3, p. 1084–94, mar. 1990.
- KILLICK-KENDRICK, R.; MOLYNEUX, D. H.; ASHFORD, R. W. Ultrastructural observations on the attachment of *Leishmania* in the sandfly. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 4, p. 269, 1974.
- KIM, N. W. et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science (New York, N.Y.)**, v. 266, n. 5193, p. 2011–5, 23 dez. 1994.
- LANDER, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860–921, 15 fev. 2001.
- LANDFEAR, S. M.; WIRTH, D. F. Structure of mRNA encoded by tubulin genes in *Leishmania enriettii*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 15, n. 1, p. 61–82, abr. 1985.
- LARSEN, F. et al. CpG islands as gene markers in the human genome. **Genomics**, v. 13, n. 4, p. 1095–107, ago. 1992.
- LEBOWITZ, J. H. et al. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. **Genes & development**, v. 7, n. 6, p. 996–1007, jun. 1993.
- LIN, J. et al. A universal telomerase RNA core structure includes structured motifs required for binding the telomerase reverse transcriptase protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 41, p. 14713–14718, 12 out. 2004.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LONDOÑO-VALLEJO, J. A.; WELLINGER, R. J. Telomeres and telomerase dance to the rhythm of the cell cycle. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 37, n. 9, p. 391–399, set. 2012.
- LÓPEZ DE SILANES, I. et al. Identification of TERRA locus unveils a telomere protection role through association to nearly all chromosomes. **Nature communications**, v. 5, p. 4723, 3 set. 2014.
- LUE, N. F. Adding to the ends: what makes telomerase processive and how important is it? **BioEssays**, v. 26, n. 9, p. 955–962, set. 2004.
- LUKE, B. et al. The Rat1p 5' to 3' Exonuclease Degrades Telomeric Repeat-Containing RNA and Promotes Telomere Elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Cell**, v. 32, n. 4, p. 465–477, 21 nov. 2008.
- MAICHER, A. et al. Deregulated telomere transcription causes replication-dependent telomere shortening and promotes cellular senescence. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 14, p. 6649–6659, 2012.
- MEDINA-ACOSTA, E.; CROSS, G. A. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple “mini-prep” procedure. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 59, n. 2, p. 327–9, jun. 1993.
- MILLER, S. I.; LANDFEAR, S. M.; WIRTH, D. F. Cloning and characterization of a *Leishmania* gene encoding a RNA spliced leader sequence. **Nucleic acids research**, v. 14, n. 18, p. 7341–60, 25 set. 1986.
- MONTERO, J. J. et al. Telomeric RNAs are essential to maintain telomeres. **Nature Communications**, v. 7, p. 12534, 17 ago. 2016.
- MORAVEC, M. et al. TERRA promotes telomerase-mediated telomere elongation in

- Schizosaccharomyces pombe. **EMBO reports**, v. 17, n. 7, p. 1–14, 2016.
- Morpholino Antisense Oligos | Gene Tools, LLC**. Disponível em: <http://www.genetools.com/morpholino_antisense_oligos>. Acesso em: 15 ago. 2017.
- MORTAZAVI, A. et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, v. 5, n. 7, p. 621–628, 30 jul. 2008.
- MOTTRAM LAB. **Leishmania Protocols for Dummies Nov16.pdf - Google Drive**. Disponível em: <<https://drive.google.com/file/d/0B5D4RaiMgCsKb0hBb0hxZ2VDRzg/view>>. Acesso em: 15 ago. 2017.
- MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, out. 2005.
- NANAVATY, V. et al. Trypanosoma brucei RAP1 maintains telomere and subtelomere integrity by suppressing TERRA and telomeric RNA:DNA hybrids. **Nucleic acids research**, v. 45, n. 10, p. 5785–5796, 2 jun. 2017.
- NAWROCKI, E. P.; EDDY, S. R. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. **Bioinformatics**, v. 29, n. 22, p. 2933–2935, 15 nov. 2013.
- NERGADZE, S. G. et al. CpG-island promoters drive transcription of human telomeres. **RNA**, v. 15, n. 12, p. 2186–2194, 1 dez. 2009.
- NETO, J. L. S. et al. Leishmania replication protein A-1 binds in vivo single-stranded telomeric DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, n. 2, p. 417–423, 2007.
- NEVES, D. P. et al. **Parasitología humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.
- PARDUE, M. L. et al. Drosophila telomeres: new views on chromosome evolution. **Trends in genetics : TIG**, v. 12, n. 2, p. 48–52, fev. 1996.
- PFEIFFER, V. et al. TERRA Promotes Telomere Shortening through Exonuclease 1–Mediated Resection of Chromosome Ends. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 6, p. e1002747, 14 jun. 2012.
- PFEIFFER, V. et al. The THO complex component Thp2 counteracts telomeric R-loops and telomere shortening. **The EMBO journal**, v. 32, n. 21, p. 2861–71, 30 out. 2013.
- PONGER, L.; LI, W.-H. Evolutionary Diversification of DNA Methyltransferases in Eukaryotic Genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 4, p. 1119–1128, abr. 2005.
- PORRO, A. et al. Molecular Dissection of Telomeric Repeat-Containing RNA Biogenesis Unveils the Presence of Distinct and Multiple Regulatory Pathways. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 20, p. 4808–4817, 15 out. 2010.
- PREVENTION, C.-C. FOR D. C. AND. CDC - Leishmaniasis. [s.d.].
- PRYDE, F. E.; GORHAM, H. C.; LOUIS, E. J. Chromosome ends: all the same under their caps. **Current opinion in genetics & development**, v. 7, n. 6, p. 822–8, dez. 1997.
- RASTROJO, A. et al. The transcriptome of Leishmania major in the axenic promastigote stage: transcript annotation and relative expression levels by RNA-seq. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 223, 4 abr. 2013.
- RAUCH, T. A. et al. A human B cell methylome at 100-base pair resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 3, p. 671–678, 20 jan. 2009.
- REIS-CUNHA, J. L. et al. Trypanosomatid Genome Organization and Ploidy. In: SILVA, M. S. DA; CANO, M. I. N. (Eds.). **Frontiers in Parasitology (Volume 1) Molecular and Cellular Biology of Pathogenic Trypanosomatids**. [s.l.: s.n.]. p. 43.
- REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- ROBINSON, K. A.; BEVERLEY, S. M. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite Leishmania. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 128, n. 2, p. 217–28, maio 2003.
- RUDENKO, G.; VAN DER PLOEG, L. H. Transcription of telomere repeats in protozoa. **The EMBO journal**, v. 8, n. 9, p. 2633–8, set. 1989.
- RUTHERFORD, K. et al. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, v. 16, n. 10, p. 944–945, 1 out. 2000.
- SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 453–483, out. 2001.
- SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 223, n. 4643, p. 1417–9, 30 mar. 1984.
- SANDHU, R. et al. A trans-spliced telomerase RNA dictates telomere synthesis in Trypanosoma brucei. **Cell Research**, v. 23, n. 4, p. 537–551, 12 abr. 2013.
- SCHOEFTNER, S.; BLASCO, M. A. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 2, p. 228–236, 23 fev. 2008.
- SEKARAN, V.; SOARES, J.; JARSTFER, M. B. Telomere Maintenance as a Target for Drug

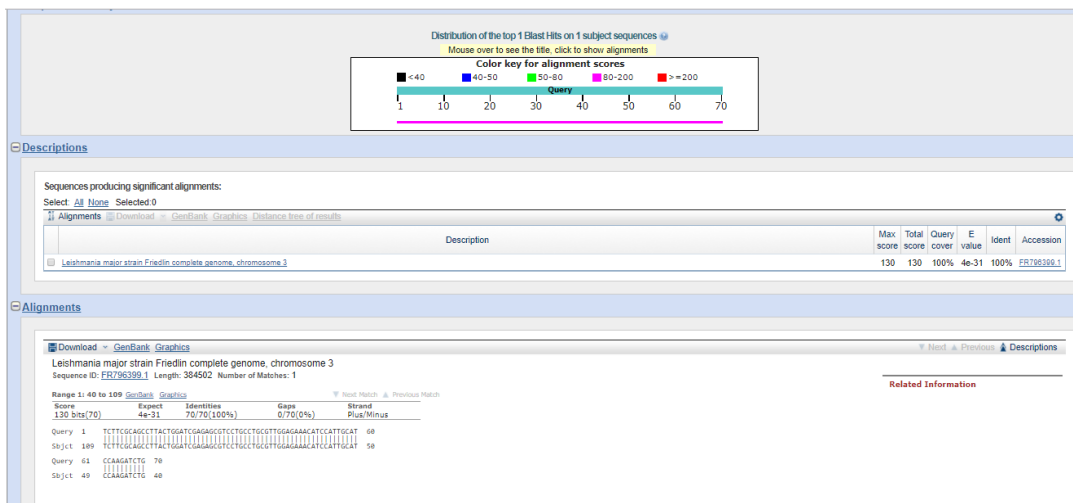
- Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 3, p. 521–538, 13 fev. 2014.
- SIMPSON, A. et al. Early Evolution within Kinetoplastids (Euglenozoa), and the Late Emergence of Trypanosomatids. **Protist**, v. 155, n. 4, p. 407–422, 1 dez. 2004.
- SINGER-SAM, J. et al. Use of a HpaII-polymerase chain reaction assay to study DNA methylation in the P_{gk}-1 CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation. **Molecular and cellular biology**, v. 10, n. 9, p. 4987–9, set. 1990.
- SMOGORZEWSKA, A.; DE LANGE, T. Regulation of Telomerase by Telomeric Proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 177–208, jun. 2004.
- SnapGene | Software for everyday molecular biology**. Disponível em: <<http://www.snapgene.com/>>. Acesso em: 15 ago. 2017.
- SoftBerry - CpGfinder HELP**. Disponível em: <<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=cpgfinder&group=help&subgroup=promoter>>. Acesso em: 18 ago. 2017.
- STONE, M. D. et al. Stepwise protein-mediated RNA folding directs assembly of telomerase ribonucleoprotein. **Nature**, v. 446, n. 7134, p. 458–461, 22 mar. 2007.
- TEIXEIRA, S. M. R.; VALENTE, B. M. Mechanisms Controlling Gene Expression in Trypanosomatids. In: SILVA, M. S. DA; CANO, M. I. N. (Eds.). **Frontiers in Parasitology (Volume 1) Molecular and Cellular Biology of Pathogenic Trypanosomatids**. [s.l: s.n.]. p. 30.
- VASCONCELOS, E. J. R. et al. The Putative Leishmania Telomerase RNA (LeishTER) Undergoes Trans-Splicing and Contains a Conserved Template Sequence. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112061, 12 nov. 2014.
- VERMELHO, A. B. et al. Carbonic anhydrases from Trypanosoma and Leishmania as anti-protozoan drug targets. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 1543–1555, mar. 2017.
- WEBER, M. et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. **Nature Genetics**, v. 37, n. 8, p. 853–862, 10 ago. 2005.
- WHO | Leishmaniasis. **WHO**, 2017.
- WRIGHT, W. E. et al. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. **Genes & development**, v. 11, n. 21, p. 2801–9, 1 nov. 1997.
- XIA, J. et al. Identification of functionally important domains in the N-terminal region of telomerase reverse transcriptase. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 14, p. 5196–207, jul. 2000.
- YU, T.-Y.; KAO, Y.; LIN, J.-J. Telomeric transcripts stimulate telomere recombination to suppress senescence in cells lacking telomerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 9, p. 3377–82, 4 mar. 2014.
- ZAKIAN, V. A. Telomeres: beginning to understand the end. **Science (New York, N.Y.)**, v. 270, n. 5242, p. 1601–7, 8 dez. 1995.
- ZAPPULLA, D. C.; CECH, T. R. From The Cover: Yeast telomerase RNA: A flexible scaffold for protein subunits. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 27, p. 10024–10029, 6 jul. 2004.
- ZAPPULLA, D. C.; GOODRICH, K.; CECH, T. R. A miniature yeast telomerase RNA functions in vivo and reconstitutes activity in vitro. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, n. 12, p. 1072–1077, 20 dez. 2005.

ATTACHMENT 1

In silico analyses of the chromosomes end termini from the right arms of chromosomes 03 and 24 of *Leishmania major*, using Blastn. Primer to STELA and Telo-PCR methods (yellow), telomeric repeat is shown in green.

>Chr03 right arm terminus

tcttcgcagccttactggatcgagagcgtctgctgcgttgagagaacatccattgcatccaagatctg**ttaggg**



>Chr24 right arm terminus

gcagcgaaggaggatcagactaaagcggccacatgccgctagactacacatccaacattcatgcccagctcagcttcacagcg
aagcaatacggcagggtacggttgc**gggttaggg**

