

Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu
Instituto de Biociências – Departamento de Genética

**Verificação da Formação de Complexos Protéicos nos Telômeros de *L.
amazonensis***

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade Estadual Paulista - Campus
de Botucatu (SP), para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Aluna: Camila Esteves de Moraes

Botucatu-SP

CAMILA ESTEVES DE MORAES

Verificação da Formação de Complexos Protéicos nos Telômeros de *L. amazonensis*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu (SP), para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Orientadora: Dr. Maria Isabel Nogueira Cano

A minha irmã Carolina

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Beto e Carminha, que sempre abriram mão de tudo pela minha formação e conquista dos meus sonhos. Minha mãe, por seu imenso conhecimento intelectual que sempre me orientou e me serve de exemplo de dedicação. Ao meu pai por alegrar todos os dias de minha vida com a melodia jazzística de seu saxofone e por me ensinar a apreciar uma boa música.

A minha irmã Carolina e meu cunhado Dudú que apesar da distância sempre vibraram com as minhas conquistas e inúmeras vezes me socorreram financeiramente. Sinto muita saudades desses dois.

Agradeço as minhas amigas de Cambuí, Pati, Cá, Fê, Jú, Lady, Marcita e Carlila, as quais são insubstituíveis e fizeram muita falta durante a minha jornada em Botucatu.

Agradeço em especial ao meu namorado Gabriel, por sua teimosia em me conquistar e por trazer poesia em minha vida, além de ser um grande companheiro e futuro namorado.

Agradeço a minha orientadora professora Maria Isabel Nogueira Cano por me tornar cientista e a todos do laboratório de telômeros.

Agradeço a FAPESP e ao Cnpq que sempre deram todo suporte para o desenvolvimento do meu projeto e pela bolsa concedida pelo Cnpq.

E por fim, agradeço a Deus, por guiar o meu caminho.

“Antes acreditávamos que nosso futuro estava nas estrelas.

Agora sabemos que está em nossos genes”

James Watson

RESUMO

Na maioria dos eucariotos, proteínas que ligam aos telômeros, tais como POT1 e TRF2 apresentam papéis cruciais na biologia dos telômeros, interagindo com vários outros reguladores dos telômeros para garantir a manutenção adequada dos mesmos e ainda formam complexos de ordem maior, conhecido como telosome ou shelterin. Os telômeros de *Leishmania spp.* são compostos por repetições conservadas TTAGGG e são mantidos pela telomerase. A base do complexo de proteínas teloméricas de *Leishmania* é formado pelas proteínas LaRPA-1 e LaRbp38, que ligam *in vitro* e *in vivo*, com alta afinidade a DNA telomérico simples fita rico em G, e por proteínas que interagem com a região de DNA telomérico dupla fita, como a proteína recentemente descrita, homólogo de TRF. O genoma de *Leishmania spp.*, como outros tripanossomatídeos, não tem muitas das proteínas conservadas que ligam a simplesfita teloméricas encontrada em eucariotes, tais como os homólogos da proteína CDC13 e POT1. Portanto, nós especulamos que o homólogo de RPA-1 de *Leishmania* pode desempenhar as mesmas funções como POT1/CDC13 nos telômeros do parasita, embora possa se ligar ao DNA telomérico simples fita com alta afinidade e de forma independente de seqüência. LaRPA-1, juntamente com a proteína multifuncional LaRbp38, que também interage com uma ampla gama de seqüências rico em GT, incluindo os telômeros, parece fazer parte de um complexo telomérico parasita que se assemelha ao complexo CST recentemente descrito. O complexo CST está sendo considerado um segundo modo de proteger os telômeros presentes em uma variedade de espécies, com exceção de leveduras de brotamento, e é constituído principalmente por proteínas RPA-like. Neste estudo, nós usamos diferentes abordagens para demonstrar que LaRPA-1 interage com o LaRbp38 e com a telomerase, e que estas interações proteína:proteína parecem ocorrer de uma forma ciclo celular independente. Além disso, LaRPA-1 co-localiza parcialmente com ambas as proteínas, provavelmente refletindo as suas funções no metabolismo do DNA. Nós especulamos se essas interações representa complexo telomérico no seu todo ou apenas a existência de distintos subcomplexos funcionais nos telômeros dos parasitas.

Palavras-chave: telômeros; proteína LaRPA-1; proteína LaRbp38; complexo CST; *Leishmania spp*

ABSTRACT

In most eukaryotes, telomere binding proteins such as POT1 and TRF2 play crucial roles in telomere biology by interacting with several other telomere regulators to ensure proper telomere maintenance and to form high order complexes known as telosome or shelterin. *Leishmania* spp. telomeres are composed by the conserved TTAGGG repeats which are maintained by telomerase. The basic *Leishmania* telomeric protein complex is formed by the proteins LaRPA-1 and LaRbp38, which bind *in vitro* and *in vivo*, with high affinity, to the G-rich single-stranded DNA, and by proteins that interact with the double-stranded region of telomeres such as the recently described TRF homologue. The *Leishmania* spp. genome, like other trypanosomatid, lacks many of the conserved single-stranded telomeric proteins found in other eukaryotes, such as the CDC13 and POT1 protein homologues. Thus, we speculate that the *Leishmania* RPA-1 homologue may play the same roles as POT1/CDC13 at parasite telomeres, although it can also bind to other single-stranded DNA with high affinity and in a sequence-independent manner. LaRPA-1 together with the multifunctional LaRbp38 protein, which also interacts with a wide range of GT-rich sequences, including telomeres, seems to form part of a parasite telomeric complex that resembles the recently described CST complex. The CST complex is being considered a second telomere capping mode occurring in a broad variety of species, except budding yeast, and is mainly formed by RPA-like proteins. In this report we used different approaches to show that LaRPA-1 interacts with both LaRbp38 and with telomerase, and that these protein:protein interactions seem to occur in a cell-cycle independent manner. In addition, LaRPA-1 partially co-localizes with both proteins, probably reflecting its functions in DNA metabolism. We speculate whether these protein interactions reflect the entire telomeric complex or the presence of functionally distinct subcomplexes at parasite telomeres.

Key word: telomere; protein LaRPA-1; protein LaRbp38; CST complex; *Leishmania spp*

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iii
.....	
AGRADECIMENTO	iv
.....	
EPÍGRAFE	v
.....	
RESUMO	vi
.....	
ABSTRACT	vii
.....	
1.	1
INTRODUÇÃO	
...	
1.1 Leishmania e Leishmaniose.....	1
1.2 Ciclo biológico dos parasitas do <i>gênero Leishmania</i>	3
1.3 Organização genômica dos parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	5
1.4 Características gerais dos Telômeros.....	6
1.5 Telômeros e proteínas associadas: Importância dos complexos multiprotéicos nos telômeros de eucariotos.....	8
.....	
1.6 O complexo telomérico de <i>Leishmania amazonensis</i>	11
2.	14
OBJETIVOS	
.....	
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Cultura de	15

parasitas.....	15
3.2 Expansão de cultura em meio 199.....	15
3.3 Obtenção de extratos totais e de núcleo de formas promastigotas de <i>L. Amazonensis</i>	15
3.4 Imunodeteção de proteínas por Western blotting.....	16
3.5 Estudo das interações proteína:proteína por imunoprecipitação utilizando-se Proteína A Sepharose (Amersham, GE Healthcare).....	16
3.6 Confirmação das interações proteína:proteína por captura usando ensaio <i>pull-down</i>	17
3.7 Análise da localização subcelular das proteínas teloméricas LaRPA-1, LaRbp38, LaTRF e LaTERT de <i>L. amazonensis</i> usando Imunofluorescência Indireta (IF).....	18
3.8 Análise da co-localização subcelular das proteínas teloméricas LaRPA-1, LaRbp38, LaTRF e LaTERT de <i>L. amazonensis</i> usando Imunofluorescência Indireta (IF).....	19
3.9 Purificação de proteínas nucleares de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> em coluna cromatográfica de troca iônica.....	20
4. RESULTADOS	22
4.1 As proteínas teloméricas LARPA-1, LaTRF, LaRbp38 e LaTERT são expressas no núcleo de formas promastigotas de <i>L. Amazonensis</i>	22
4.2 Confirmação da localização subcelular de LaRPA-1, LaTRF, LaRbp38 e LaTERT por imunofluorescência indireta (IF).....	23
4.3 As proteínas teloméricas LaRPA-1, LaTRF, LaRbp38 e LaTERT co-imunoprecipitam em extratos nucleares de formas promastigotas.....	25
4.4 Confirmação das interações proteína:proteína por ensaio de captura por <i>pull-down</i>	26
4.5 Indícios de co-localização subcelular entre as proteínas teloméricas no núcleo de formas promastigotas de <i>L. Amazonensis</i>	29
4.6 As proteínas LaTRF, LaRPA-1, LaRbp38 e LaTERT co-eluem durante a purificação de extratos nucleares em coluna cromatográfica de troca iônica.....	32
4.7 Mais uma confirmação da interação física entre as proteínas teloméricas LaRPA-1 e LaRbp38 de formas promastigotas de <i>L. Amazonensis</i>	33
5. RESULTADOS COMPLEMENTARES	35
5.1 Tentativas de isolar complexos protéicos de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> por cromatografia em gel filtração.....	35

5.2 As proteínas teloméricas LaTRF e LaRPA-1 são expressas no núcleo de formas amastigotas de <i>L. Amazonensis</i>	38
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÃO	44
8. BIBLIOGRÁFICAS	REFERÊNCIAS 45

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Leishmania* e Leishmaniose

Leishmaniose é uma doença de caráter zoonótico que acomete o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos. O agente etiológico dessa zoonose é um protozoário do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida (Neves, 2005). Estes parasitas são caracterizados pela presença do cinetoplasto, uma organela rica em DNA que representa um compartimento especializado de uma única mitocôndria (Simpson, 2004). O gênero *Leishmania* apresenta mais de 13 espécies distintas de protozoários dentre as quais estão incluídos os agentes causais da leishmaniose. Todas as espécies de *Leishmania* são heteroxênicas, ou seja, necessitam de mais de um hospedeiro durante seu desenvolvimento biológico. A transmissão é feita por insetos hematófagos (hospedeiros invertebrados) denominados flebotomíneos, do gênero *Lutzomyia*, conhecidos como mosquito-palha, birigui, tatuquiras entre outros. Os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedades de mamíferos, sendo mais comuns: roedores, canídeos, tamanduás, marsupiais e, sobretudo, humanos (Neves, 2005).

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

Dependendo dos fatores de virulência do parasita infectante e da resposta imune do hospedeiro humano, um grande espectro de formas clínicas de leishmaniose pode se manifestar (Neves, 2005; Rey, 2002).

A OMS (Organização Mundial da Saúde) classifica as leishmanioses em quatro formas clínicas principais: leishmaniose visceral, também conhecida como “calazar”, é a forma mais grave da doença, na qual os parasitas apresentam tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear do baço, do fígado, da medula óssea e dos tecidos linfóides; leishmaniose mucocutânea, também conhecida como úlcera de Bauru, apresentando formas que se complicam freqüentemente com o aparecimento de lesões destrutivas nas mucosas do nariz, boca e faringe; leishmaniose cutânea, que produz exclusivamente lesões cutâneas, ulcerosas ou não, porém restritas; leishmaniose cutânea difusa, com formas disseminadas cutâneas que se apresentam em indivíduos anérgicos ou, tardiamente, em pacientes que haviam sido tratados de calazar (Rey, 2002).

No Brasil, os medicamentos empregados no tratamento da leishmaniose visceral são os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B (desoxicolato e lipossomal) (Alvar J, et al., 1997). A anfotericina B é a única opção no tratamento de gestantes e está indicada como segunda opção para os pacientes que tenham contra-indicações ou tenham apresentado toxicidade ao uso dos antimoniais. Estes fármacos podem causar graves efeitos colaterais nos pacientes, como dores musculares e alterações nos batimentos cardíacos, sendo que a anfotericina B lipossomal apresenta menor toxicidade, porém seu custo é elevado, dificultando seu uso em saúde pública (Ministério da Saúde -Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2006).

Atualmente a imunoterapia tem mostrado resultados promissores, com o desenvolvimento de vacinas cujas técnicas ainda vêm sendo testadas e aprofundadas nos dias de hoje. (Instituto Oswaldo Cruz, 2008).

As medidas que são empregadas para a redução da transmissão, o controle dos vetores e o tratamento farmacológico da infecção acabaram induzindo o aparecimento de parasitas e vetores resistentes (Johnston et al., 1999). Por esses motivos, um maior conhecimento sobre a biologia celular e molecular destes protozoários poderá facilitar o descobrimento de novos alvos parasita-específicos para o desenvolvimento de vacinas e drogas eficazes para a erradicação da doença.

O parasita alvo deste estudo é a *L. amazonensis*, agente causal das leishmanioses Tegumentar Americana (cutânea e cutânea-difusa). 75% de todos os casos clínicos de leishmaniose, distribuídos por vários continentes, é do tipo cutânea, e os 25% restantes são de casos de leishmaniose visceral (Kaye & Blackwell, 2008). A leishmaniose tegumentar americana está entre uma das endemias de maior importância em saúde pública no Brasil, sendo que em algumas regiões do país, o parasita causador da doença aparece como agente causal de todo o espectro da leishmaniose (Barral et al., 1991). Ele tem ampla distribuição geográfica, encontrando-se por toda bacia amazônica, além de estados como Maranhão, Ceará, Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo (Neves, 2005; Rey, 2002). Em Mato Grosso do Sul, a leishmaniose cutânea e cutânea-difusa apresenta ampla distribuição (Noguchi, 2001).

1.2 Ciclo biológico dos parasitas do gênero *Leishmania*

Os parasitas do gênero *Leishmania* possuem ciclo de vida digenético, em que há a alternância entre a forma intracelular aflagelada, denominada amastigota, a qual é encontrada no hospedeiro vertebrado (homem, cães e outros animais) e a forma extracelular flagelada, ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor (Neves, 2005).

A

B

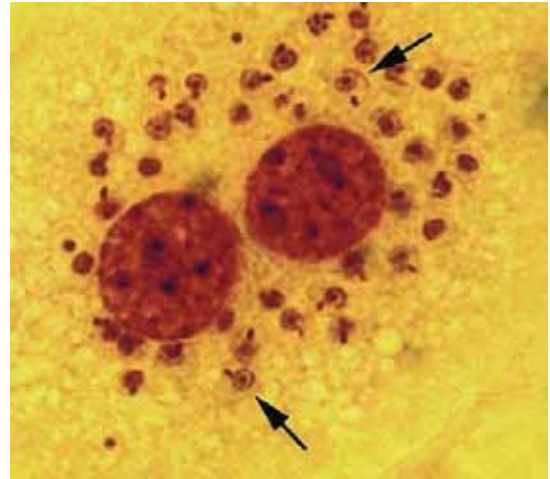


Fig. 1: Formas dos parasitas do gênero *Leishmania*. Em A, parasitas na forma promastigota, flagelada, alongada, e em B, setas indicam diversos parasitas na forma amastigota, aflagelada, arredondadas.

Fontes: A (http://www.id.med.ubc.ca/__shared/assets/Leishmania223.jpg) B (Murray et al., 2005)

A reprodução ocorre por divisão binária simples em ambos os hospedeiros. A infecção no vetor ocorre quando a fêmea pica o vertebrado para exercer o repasto sanguíneo e juntamente com o sangueingere macrófagos parasitados por formas amastigotas. Estes ao chegarem no estômago, são rompidos liberando as amastigotas, as quais sofrem divisão binária e se transformam rapidamente em promastigotas que multiplicam-se sucessivamente e migram em direção à faringe do inseto. Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do inseto vetor introduz as formas infectivas, ou promastigotas, ao hospedeiro mamífero, que são fagocitadas por macrófagos superficiais e no seu interior se transformam em amastigotas. Estes amastigotas se dividem por bipartição até o momento quando ocorre a lise do macrófago, neste instante muitos amastigotas caem na corrente sanguínea e são novamente fagocitados

por novas células do sistema monocítico fagocitário do hospedeiro. O ciclo se completa quando um mosquito flebotomíneo não infectado alimenta-se do sangue de um hospedeiro infectado e as formas amastigotas voltam a se diferenciar em promastigotas no intestino do inseto. (Neves, 2005; Basu & Ray, 2005; Oliver et al., 2005; Lang et al., 2009). O tempo necessário para que o ciclo se complete varia entre três a cinco dias para diferentes espécies (Neves, 2005; Rey, 2002). A figura 2 apresenta uma ilustração simplificada do ciclo biológico de *Leishmania amazonensis*.

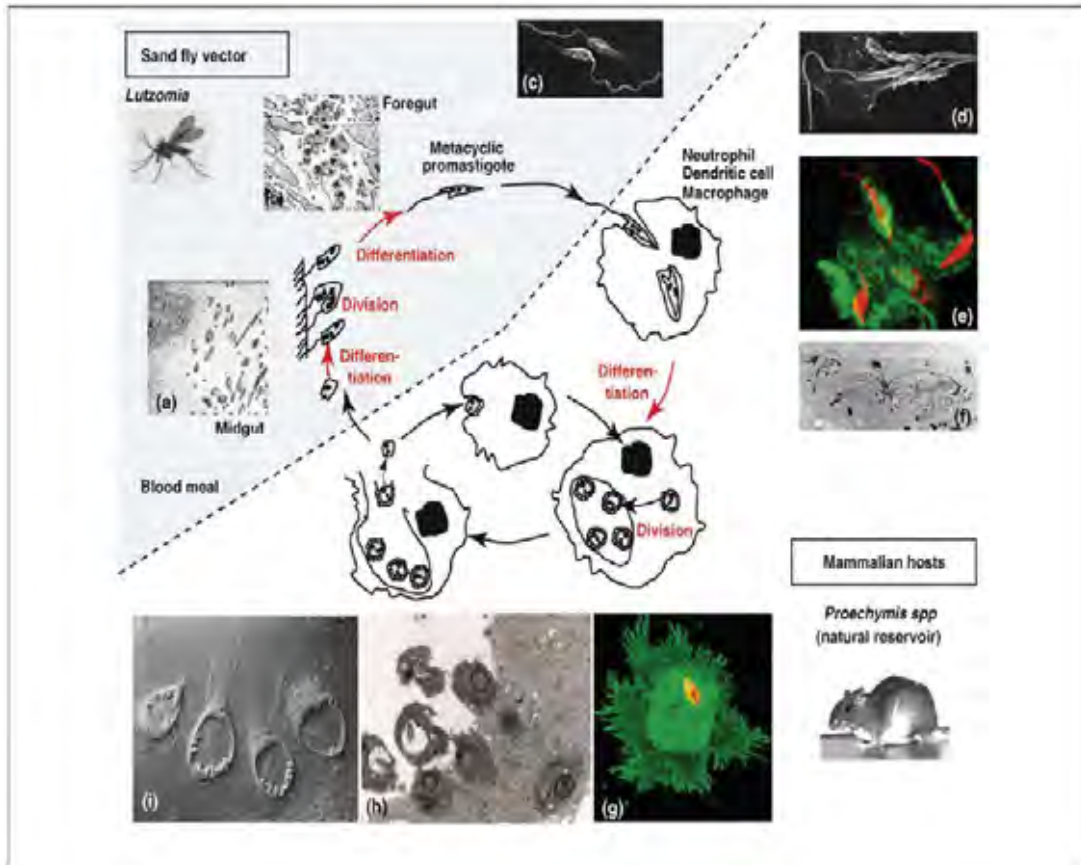


Fig. 2: Ciclo biológico de *L. amazonensis*: imagens bi e tridimensionais de amostras fixadas no interior do inseto vetor (*Lutzomia*) e em reservatório natural (*Proechymis spp*). (a) Promastigotas procíclicos no trato digestivo médio do inseto. (b) Promastigotas metacíclicos no trato digestivo anterior. (c) Promastigotas metacíclicos. (d, e, f, h, i) Macrófagos infectados. (g) Célula dendrítica infectada. (e, f) Promastigotas no fagossomo minutos após fagocitose. (f, h, i) Formação do vacúolo digestivo onde ocorre a transformação dos promastigotas metacíclicos em amastigotas e proliferação dos parasitas (Lang et al., 2009).

1.3 Organização genômica dos parasitas do gênero *Leishmania*

O genoma nuclear de protozoários do gênero *Leishmania* contém aproximadamente 65 Mb, o número de genes é de 8-10 mil, que podem estar presentes em cópias únicas, duplicados ou em múltiplas cópias repeditas em *tandem*, organizado em 32 a 36 cromossomos lineares que variam de tamanho entre 0,35 e 3,0 Mb e a condensação durante o ciclo mitótico não é observável, o que dificulta qualquer tipo de análise citogenética (Wirth, 1990; Johnston et al., 1999; Wincker et al., 1996; Stiles et al., 1999). Certas espécies, entretanto como a *L. major*, cujo genoma haplóide foi sequenciado completamente, apresenta 34 ou 35 cromossomos (Ivens et al., 2005).

Os genes de *Leishmania* sp. não apresentam íntrons, assim estes parasitas transcrevem seus genes a partir de um único RNA (poliscitrônico), que é processado por trans-splicing (Gopal, et. al., 2005; Stiles et al., 1999). Devido à ausência de promotores gênicos individuais típicos, estima-se que a regulação gênica em *Leishmania* sp. ocorra principalmente em nível pós-transcricional (Myler et al. 2001). As seqüências flanqueadoras (intergênicas) exibem consideráveis divergências, mesmo entre genes intimamente correlacionados (Vanhamme & Pays, 1995; Stiles et al, 1999). O genoma mitocondrial está contido no cinetoplasto, constituído de minicírculos e maxicírculos de kDNA que apresentam replicação autônoma e ocorre também edição de RNAs mitocondriais. O DNA mitocondrial compreende de 10-15% do DNA total da célula (Neves, 2005; Simpson et al., 2004; Degraeve et al., 1994).

O recente sequenciamento dos genomas de *Leishmania infantum* e de *Leishmania braziliensis*, mostraram que a composição genética dessas duas espécies apresenta poucas diferenças com o genoma de *Leishmania major* decodificado em 2005. Estudos moleculares mostraram que somente 200 dos

mais de 8 mil genes que compõem o genoma desse parasita estavam distribuídos de um modo diferente dependendo da espécie. Somente 5 genes de *L. major* estavam ausentes nos genomas das outras duas espécies analisadas. (Ivens et al., 2005; Peacock et al., 2007). Dessa forma, pode-se concluir que, talvez, apenas poucos genes do parasita sejam importantes para determinar que tipo de doença será desenvolvido depois da infecção, e talvez o genoma do infectado desempenhe um papel mais importante nas manifestações clínicas da doença (Peacock et al., 2007).

1.4 Características Gerais dos telômeros

O DNA telomérico, em geral, é formado por repetições em tandem de seqüências curtas e ricas em G. O DNA se apresenta na forma de dupla-fita (sendo uma fita rica em G e a outra rica em C) e de simples fita, rica em resíduos do tipo G (Chan & Blackburn, 2004; Blackburn, 2005). Esta última forma uma protrusão em direção à extremidade cromossômica que é conhecida como “3’ *G-overhang*”, e a sua presença é conservada desde eucariotos unicelulares até vertebrados superiores (Myler et al., 2000; Henderson & Blackburn, 1993; Wright et al., 1997). Adjacente aos telômeros se encontra a região subteloamérica que, nos eucariotos, é composta de repetições não conservadas (Henderson, 1995; Fu & Barker, 1998). O DNA telomérico é o sítio de ligação das proteínas teloméricas que formam o “cap” protetor nos terminais cromossômicos e regulam a atividade da telomerase. Além de sítio de ligação de proteínas, a simples-fita telomérica também é o substrato da telomerase e é capaz de assumir diferentes estruturas que vão regular o acesso da mesma aos telômeros e ajudar na formação do “cap” (Blackburn, 2005; de Lange, 2005). Uma dessas estruturas é conhecida como G-quadruplex (Fang & Cech, 1993; Baird & Farr, 2006) e T-loop. (Muñoz-Jordan et al., 2001). A formação de ambas estruturas já foi observada em células de mamíferos, ciliados, plantas, tripanosomatídeos e leveduras, e o tamanho do T-loop varia entre os diferentes organismos (Griffith et al., 1999; Muñoz-Jordan et al., 2001; de Lange, 2004; Gilson & Geli, 2007). Em humanos sabe-se que a proteína TRF2 (*Telomere repeat factor 2*) tem sido associada com a formação do T-loop (de Lange, 2004; Griffith et al., 1999;

Steensel, 1998; Smorzewska, 2000), porém pouco se conhece sobre sua dinâmica de formação, de sua regulação por proteínas teloméricas e da persistência por todo o ciclo celular (Palm & de Lange, 2008).

A telomerase é a enzima responsável por alongar as extremidades dos cromossomos lineares durante o ciclo celular, impedindo que ocorra o encurtamento dos mesmos, mantendo os telômeros íntegros (Bryan & Reddel, 1995; Blackburn, 2005, Gilson & Geli, 2007; Lingner et al., 1995). Além do mecanismo que utiliza a ação da telomerase existe um mecanismo alternativo denominado de ALT (*alternative lengthening of telomeres*), o qual mantém os telômeros independente da atividade da telomerase. Esse mecanismo alternativo envolve a replicação do DNA mediada por recombinação homóloga entre sequências teloméricas (Teng e Zakian, 1999; Hensen et al., 2000).

Os telômeros de tripanosomatídeos como *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania* spp., apresentam aspectos conservados que são comparáveis com outros eucariotos, isso inclui a sequência telomérica do tipo 5'-TTAGGG-3', encontrada em vertebrados (Cano, 2001; Conte & Cano, 2005). À semelhança de outros eucariotos, eles também são mantidos pela ação da ribonucleoproteína telomerase (Cano et al., 1999; Cross, et al, 2007; Giardini et al., 2006) e por algumas proteínas ligantes de DNA telomérico (Fernández et al., 2004). Nas adjacências das extremidades teloméricas encontra-se a região subteloamérica denominada de LCTAS ("*Leishmania* conserved telomere-associated sequence"). Aí estão contidos blocos de sequências conservadas (CSB1 e CSB2), os quais são considerados sítios de ligação para proteínas teloméricas (Fu & Barker, 1998).

1.5 Telômeros e proteínas associadas: Importância dos complexos multiprotéicos nos telômeros de eucariotos.

Integradas ao telômero há um grande número de proteínas que formam complexos importantes para a atividade dos telômeros. Tais proteínas são responsáveis por exercer funções de duas maneiras: estruturalmente, pela formação de uma capa de proteção nos telômeros, e funcionalmente, pela

regulação do comprimento dos telômeros. Proteínas teloméricas podem ter associação direta ao DNA, a outras proteínas teloméricas, ou ainda ter associação a outros fatores, como os que compõem a maquinaria de reparo a danos ao DNA. As funções destas proteínas teloméricas variam, mas parecem estar associadas à região do telômero com a qual elas interagem. Proteínas que se associam à fita simples do DNA telomérico participam no recrutamento da telomerase e influenciam a elongação telomérica. Proteínas que se associam à fita dupla estão envolvidas na manutenção do T-loop e regulam a telomerase negativamente (Palm & de Lange, 2008; Smogorzewska & de Lange, 2004; Aubert & Landsorp, 2008; Dmitriev et al, 2003; de Lange, 2005).

Em mamíferos seis proteínas se associam a repetição TTAGGG no terminal dos cromossomos formando um complexo nucleoproteico denominado *shelterin*, como apresentado na figura 3 (de Lange, 2005). Este complexo permite distinguir as células normais de células com quebra de DNA nas extremidades dos cromossomos, desta forma, reprimindo ações de reparo no DNA e regulando a manutenção dos telômeros via telomerase (Liu et al., 2004). Os componentes de *shelterin* localizam-se especificamente nos telômeros, sendo abundantes nos telômeros ao longo do ciclo celular e não apresentam funções em outras partes do núcleo. A especificidade de *shelterin* por reconhecer as repetições TTAGGG do DNA telomérico ocorre por três de seus componentes: TRF1 (*TTAGGG telomere repeat binding factor 1*), TRF2 (*TTAGGG telomere repeat binding factor 2*), e POT1 (*Protection of telomeres 1*). TRF1 e TRF2 ligam a dupla fita de DNA telomérico enquanto POT1 liga a região de simples fita telomérica. Essas três proteínas são interconectadas por outras três proteínas que não interagem diretamente com o DNA telomérico, são elas: TIN2 (*TRF1 Interacting Nuclear protein 2*), TPP1 (*Tripeptidyl Peptidase 1 ou POT1 binding partner*) e RAP1 (*Repressor Activator Protein 1*). (Palm & de LANGE, 2008). TIN2 desempenha um papel chave no complexo recrutando TPP1/POT1 para TRF1 e TRF2 além de ser responsável por estabelecer a interação direta entre TRF1 e TRF2, contribuindo para a estabilização de TRF2 nos telômeros (Ye et al., 2004). TPP1 interage tanto com POT1 quanto com TIN2 através de um domínio do tipo *OB fold* e forma heterodímeros com POT1, recrutando POT1 para os telômeros (Hockemeyer, 2007). A proteína POT1 por sua interação

com a proteína TPP1 é capaz de recrutar a telomerase para o terminal telomérico aumentando a processividade do complexo (Xin et al., 2007; Wang et al., 2007). RAP1 interage principalmente com TRF2 (Van Steensel et al., 1998; Li e de Lange, 2003). Este complexo não é estático, mas sofre constante remodelamento atuando junto com fatores de reparo de DNA e desta forma transforma e protege os telômeros (de Lange, 2005).

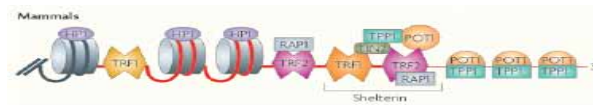


Fig. 3: Complexo nucleoproteico shelterin de mamíferos: Interações entre as proteínas teloméricas que conferem estabilidade ao telômero. Fonte: Gilson & Geli, 2007.

Em leveduras, um complexo semelhante a *shelterin* foi denominado telossomo, como demonstrado na Fig 4. Neste complexo as proteínas RAP1 e CDC13 apresentam funções chaves para a manutenção dos telômeros nestes organismos (Dmitriev et al., 2003; Gilson & Geli, 2007). A proteína CDC13 é o homólogo funcional de POT1 e é conhecida por proteger a simples fita telomérica de *S. cerevisiae* (Nugent et al., 1996; Anderson et al., 2002). Nestes organismos a dupla fita do DNA telomérico é coberta por proteínas RAP1, que além de exercerem função semelhante a TRF2 humana, interagem com Rif1 e Rif2 (*RAP1 interacting factors 1 and 2*), as quais controlam negativamente a ação da telomerase. (Dmitriev et al., 2003; Gilson & Galli, 2007).

Na fita simples do DNA telomérico as proteínas Stn1 e Ten1, que interagem com CDC13, também são importantes na regulação do tamanho dos telômeros (Evans & Lundblad, 1999). Elas apresentam similaridade com duas subunidades da proteína RPA (*“replication protein A”*, subunidades *RPA-2 e RPA-3*). CDC13 também interage com RPA e é capaz de ativar a telomerase

através de interação com Est1 (*Ever shorter telomeres 1*), sugerindo um mecanismo sinérgico entre as três proteínas (Schramke et al., 2004; Smogorzewska & de Lange, 2004; Yang et al., 2009; Evans & Lundblad, 1999). Além disso, CDC13 participa da replicação do DNA (Bianchi & Shore, 2007) na fita C e ainda pode impedir o acesso da telomerase ao terminal telomérico por um mecanismo ainda pouco conhecido, atuando como reguladora negativa da elongação telomérica (Chandra et al, 2001).

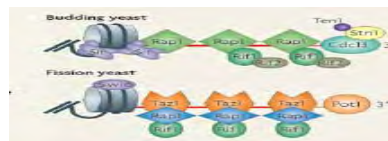


Fig. 4: Complexo telossomo de *S. cerevisiae*. DNA telomérico dupla fita, ligando proteínas Rap1, que interagem com suas parceiras Rif1 e Rif2 (*Rap1 interacting factor 1 and 2*) as quais controlam negativamente a telomerase. Cdc13 recobre a fita simples rica em G e forma um complexo com Stn1 e Ten1. Fonte: Gilson & Geli, 2007

Diferente das proteínas componentes de *shelterin*, as quais apresentam funções somente nos telômeros, o complexo CST apresenta funções não exclusivas teloméricas, sendo descrito em leveduras, plantas e humanos (Wellinger, 2009). Em leveduras este complexo CST é composto pelas proteínas CDC13, Stn1 e Ten1 que são reguladores da atividade de telomerase (Wellinger, 2009; Gao et al., 2007; Sun et al., 2009). Essas proteínas são consideradas proteínas *RPA-like*, pois compartilham alta semelhança ao complexo heterotrimérico RPA (*“replication protein A”*, subunidades *RPA-1 RPA-2 e RPA-3*), por conter supostos domínios OB-fold e se ligarem ao DNA telomérico simples fita (Miyake et al., 2009; Sun, et al., 2009; Wellinger, 2009). Além disso, partes da proteína STN1 pode substituir funcionalmente a subunidade 2 da RPA, adicionando a idéia da existência de duas RPAs diferentes ou da presença de uma RPA telomérica em leveduras (Gao, 2007). O compelxo CST pode interagir com

DNA polimerase alfa e com a telomerase (TERT), e orquestrar a síntese de ambas as fitas teloméricas (Wellinger, 2009) e ainda funciona independentemente de POT1. A proteína CDC13 tem alta afinidade pela sequência telomérica rica em G (Lin & Zakian, 1996). Em plantas e mamíferos, a proteína CDC13, é substituída por um novo componente telomérico denominado Ctc-1 (*Conserved Telomere maintenance Component 1*), a qual parece não ser muito conservada entre as espécies (Surovtseva et al., 2009; Miyake et al., 2009; Wellinger, 2009). Junto com o complexo *shelterin*, as CST, (CDC13-Stn1-Ten1 e Ctc-1-Stn1-Ten1) são responsáveis pela manutenção e estabilidade telomérica. (Miyake et al., 2009; SUN, et al., 2009; Wellinger, 2009).

1.6 O complexo telomérico de *Leishmania amazonensis*

Nos telômeros de *Leishmania amazonensis* foram detectadas proteínas que estão associadas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Fernández et al., 2004; Lira et al., 2007b; Lira et al., 2007c). Dentre as proteínas que se associam a simples-fita dos telômeros estão a LaRBP38 (*Leishmania amazonensis RNA binding protein*) e LaRPA-1 (Replication Protein A, subunit 1) (Lira et al., 2007b; SiqueiraNeto et al., 2007). Também já foram identificadas proteínas que se associam à dupla-fita telomérica. Entre elas estão LaTBP1 (*Leishmania amazonensis Telomere Binding Protein 1*), LaRBP38 (LIRA et al., 2007c) e LaTRF (*Leishmania amazonensis TTAGGG Repeat Binding Factor*) (da Silva et al., 2010). A unidade catalítica da telomerase (TERT em humanos), responsável pela elongação dos terminais cromossômicos, também já foi caracterizada (Cano et al., 1999; Giardini et al., 2006). A proteína LaTRF, homóloga funcional das proteínas TRF de mamíferos interage e co-localiza com o DNA telomérico (da Silva et al., 2010).

LaRPA-1 e LaRbp38 foram isoladas de extratos nucleares em colunas cromatográficas de afinidade (Fernandez et al., 2004). Rbp38 é uma proteína que parece ser conservada somente entre protozoários da família dos tripanosomatídeos. É codificada por um gene nuclear, mas a sua localização subcelular mostra que a proteína é enriquecida na fração mitocondrial, porém também pode ser

encontrada no núcleo, embora a maior parte do tempo, localiza-se no cinetoplasto. Ela parece estar envolvida tanto com funções no cinetoplasto (kDNA) quanto nos telômeros (Lira et al, 2007b; Perez et al., in preparation). A proteína RPA-1 (RPA - *Replication Protein A*) é conservada na escala evolutiva entre os eucariotos, sendo essencial na manutenção dos telômeros devido a sua capacidade de ativar a telomerase. (Smith et al., 2000, Schramke et al., 2004, Kibe et al., 2007, Kobayashi et al., 2010). Em leveduras, interage com as proteínas Est1 e CDC13 recrutando a telomerase para os telômeros na fase S do ciclo celular (Schramke et al., 2004). Em *Leishmania*, a subunidade 1 das RPA (LARPA-1) interage e co-localiza *in vitro* e *in vivo* com os telômeros do parasita (Siqueira Neto et al., 2007). Apesar de compartilhar características estruturais com as RPA de outros eucariotos, as RPA-1 de vários protozoários, incluindo as de *Leishmania*, não possuem o domínio RPA-70 N de interação com proteínas da maquinaria de recombinação, mas apresentam o domínio OB-fold de ligação ao DNA (Jacobs et al., 1999; Siqueira Neto et al., 2007). Curiosamente, no genoma de *Leishmania* não existem homólogos às proteínas teloméricas Cdc13 e POT1. CDC13 é exclusiva de leveduras, enquanto POT1 e suas isoformas são conservadas em praticamente todos os eucariotos (SHAKIROV et al., 2009). Deste modo, a ausência de homólogos destas proteínas em *Leishmania* sugere que LaRPA-1 possa cumprir a função destas proteínas nos telômeros do parasita (Siqueira Neto et al., 2007).

Visto que o papel dos complexos multiprotéicos na manutenção telomérica vai além de qualquer função isolada, o presente trabalho tem como objetivo verificar uma possível formação desses complexos proteicos nos telômeros de *L. amazonensis*. O entendimento do mecanismo de regulação da manutenção telomérica poderá levar ao descobrimento de algum alvo potencial para o desenvolvimento de novas drogas para erradicar a leishmaniose. A Fig. 5 mostra o panorama atual dos telômeros de *Leishmania amazonensis*.



Fig. 5: Panorama atual dos telômeros de *Leishmania*. Em marrom está representado o DNA telomérico, composto por uma porção dupla-fita, formado pela repetição TTAGGG em *tanden* e as seqüências subteloméricas (“Leishmania Conserved Telomere Associated Sequences”) e a protrusão 3’G-overhang. As formas ovais coloridas representam as proteínas já identificadas interagindo com o DNA telomérico na forma de dupla fita: LaTBP1, LaTRF2, LaRBP38 e simples fita: LaRBP38, LaRPA-1 e telomerase.

2. OBJETIVOS

Os objetivos iniciais foram identificar possíveis interações entre a proteína LaTRF e outras proteínas teloméricas já descritas em *Leishmania*, a fim de se verificar a formação de complexos protéicos nos telômeros do parasita.

Em vista dos resultados que foram sendo gradativamente alcançados e dos progressos sobre este tema na literatura, percebemos que o objetivo desta dissertação deveria ser mais amplo e incluímos neste estudo a identificação de proteínas que interagem com a proteína telomérica LaRPA-1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de Parasitas

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, cepa MHOM/BR/73/M2269 foram cultivadas a 28 °C em meio 199 (Cutilab), suplementado com 10% soro fetal bovino e 1X solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e antimicótico (Anfotericina B).

3.2 Expansão de cultura de parasitas em meio 199

A expansão de cultura de formas promastigotas de *L. amazonensis* foi inicialmente realizada através de um inóculo de 5×10^5 parasitas/ml, em 20 ml de meio de cultura. Os parasitas em cultura foram incubados a 28 °C durante quatro dias (fase exponencial de crescimento). Após este período, outros 80 ml de meio de cultura foram acrescentados aos 20 ml iniciais. A cultura foi novamente incubada a 28 °C por mais quatro dias. Após este período foi acrescentado mais 400 ml de meio de cultura, atingindo assim uma totalidade de 500 ml de cultura expandida. A cultura expandida foi centrifugada a 3500 rpm durante 15 minutos e o “pellet” contendo as células foi utilizado para a obtenção de extratos protéicos.

3.3 Obtenção de extratos protéicos totais e de núcleo de formas promastigotas de *L. Amazonensis*

Para obtenção de extratos proteicos totais de formas promastigotas foi utilizado tampão de lise, também denominado RIPA (150mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS) suplementado com inibidor de proteases (Sefton, 2005). Extratos de núcleo de formas promastigotas foram obtidos segundo protocolo proposto por Fragaki et al. (2007), a partir de uma cultura em fase mid log de crescimento. Os parasitas foram lavados três vezes em 1X PBS por centrifugação (206 g) por 5 min. a 4° C e incubadas por 10 min. no gelo em 0,5 ml de tampão de lise I (Hepes 10 mM, pH 7.5, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM, DTT 0.5 mM, NP40 0.5%, suplementado com 1X coquetel de inibidores de proteases). Após a incubação, o pelete foi centrifugado (1.460 g) por 10 min. a 4° C e o sobrenadante resultante foi coletado e usado como extrato de citoplasma. O pelete contendo o núcleo foi incubado por 20 min. no gelo com 0.1 ml de tampão de lise II (Hepes 20 mM, pH 7.5, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 840mM, DTT 0.5 mM, glicerol 25%, EDTA 0.2 mM, suplementado com 1X coquetel de inibidores de proteases) e então centrifugado (15.500 g) por 15 min. a 4° C. O sobrenadante resultante foi recuperado e usado como extrato nuclear. Os extratos das frações subcelulares (núcleo e citoplasma) e de RIPA foram estocados no freezer a -80 °C.

3.4 Imunodeteção de proteínas por Western blotting

Proteínas provenientes dos ensaios realizados foram fracionadas em géis SDS-PAGE 8%,10% e 15% e transferidas para membrana de nitrocelulose (BioRad) em tampão de transferência (48 mM Tris Base, 39 mM glicina, 20% metanol e 0,0375% SDS) por 16 h a 4 °C (Sambrook & Russel, 2001), utilizando-se o aparato Trans-Blot Cell (BioRAD). A detecção das proteínas foi realizada utilizando-se soros imunes anti-LaRPA-1, anti-LaRbp38, anti-LaTRF e anti-LaTERT, obtidos em coelho e soro imune anti-LaRPA-1, obtido em camundongo e o kit ImmunoStar (BioRAD). Soro imune contra a proteína LaTRF foi produzido em coelho, a partir de um peptídeo (N-APAVTTRKRPRSSDSP-C) sintetizado pela Sigma. Soros contra as proteínas LaRPA-1, telomerase (LaTERT) e contra a proteína

LaRbp38 foram produzidos a partir de proteínas recombinantes expressas em sistema bacteriano em nosso laboratório (Lira et al., 2007b; Siqueira Neto et al., 2007 e Giardini & Cano, não publicado).

3.5 Estudo das interações proteína:proteína por imunoprecipitação utilizando-se Proteína A Sepharose (Amersham, GE Healthcare)

Para tal ensaio foram utilizados extratos de núcleos, contendo 2×10^9 células de formas promastigotas de *L. amazonensis* preparados de acordo com Fragaki et. al., (2007). Proteína A Sepharose (Amersham, GE Healthcare) (50 μ l de resina) foi equilibrada em tampão IP (25 mM TRIS-HCl pH 8.0, 10% glicerol, 2 mM EDTA e 0,1% coquetel de inibidores de proteases) e em seguida adicionou-se 175 μ g de soro de coelho anti-LaTRF ou anti-LaRPA-1 (de acordo com as especificações do fabricante). Nestes ensaios, antes de se proceder com a imunoprecipitação, os extratos contendo 1,29 mg de proteínas, foram pré-clareados com 20 μ l de Proteína A pré-equilibrada em tampão IP por 4 horas a 4° C, de forma a se retirar da mistura proteínas que tivessem afinidade inespecífica a Proteína A. Os extratos protéicos pré-clareados, foram misturados por 4 horas a 4 °C, separadamente, aos anticorpos anti-LaTRF ou anti-LaRPA-1 previamente acoplados a proteína A. Após o período de incubação procedeu-se com as lavagens usando tampão IP. Os imunoprecipitados foram ressuspensos em 1X tampão SDS-Loading contendo 2,8% de beta-mercaptoetanol e em seguida fracionados em géis 8%,10% e 15% SDS-PAGE e analisados por Western blot.

3.6 Confirmação das interações proteína:proteína por captura usando ensaio *pull-down*

O método *pull-down* é muito utilizado para determinar a interação física entre duas ou mais proteínas e para se confirmar interações que foram previamente observadas por outras técnicas, como as de imunoprecipitação ou co-imunoprecipitação. Para este ensaio, utilizamos o protocolo descrito por Webb e colaboradores (Webb *et al.*, 1997), com as modificações que foram necessárias. Utilizamos 200

µg de resina Ni-NTA Super-Flow (Quiagen) e 200 µg de proteína recombinante LaRPA-1 purificada ou 200 µg de LaRBP38 recombinante purificada, conforme protocolos descrito em LIRA et al. (2007 b e d). Extratos proteicos totais (ver item 3.3), obtidos de formas promastigotas de *L. amazonensis*, contendo 1,160 mg de proteínas foram utilizados para se capturar os possíveis interatores de ambas as proteínas. A resina foi equilibrada em tampão A (50mM Tris-HCl pH 8,0, 0,01% de NP40, 1% de inibidor de protease) e em seguida adicionou-se 200 µg de proteína recombinante LaRPA-1 ou LaRBP38 e deixou-se incubando overnight a 4°C. Os extratos proteicos foram diluídos com tampão A e pré-clareados com 40 µl de resina pré-equilibrada em tampão A por 4 horas a 4° C. Os extratos protéicos pré-clareados, foram misturados a resina contendo a proteína recombinante LaRPA-1 ou LaRBP8 como ligante e foram incubados por 4 horas a 4 °C. Após a incubação, a resina contendo os complexos foi exaustivamente lavada com tampão A e ressuspensa em 1X tampão SDS-Loading contendo 2,8% de beta-mercaptoetanol. As proteínas interatoras de LaRPA-1 ou LaRBP8 foram fracionadas em géis 8%,10% e 15% SDS-PAGE e analisados por Western blot. Este último ensaio foi realizado em colaboração com a aluna Arina Perez, aluna de doutorado do nosso laboratório.

3.7 Análise da localização subcelular das proteínas teloméricas LaRPA-1, LaRbp38, LaTRF e LaTERT de *L. amazonensis* usando Imunofluorescência Indireta (IF)

Para os ensaios de localização por imunofluorescência Indireta (IF), lâminas de vidro foram previamente lavadas e tratadas com 0,1% de poli-L-lisina (Sigma). 1×10^6 formas promastigotas de *L. amazonensis* de 4 dias de cultura, foram centrifugados a 2800 RPM durante 5 min., lavados com 1 ml de 1X PBS gelado e em seguida foram fixados com formalina 1% (formaldeído 36,5%) por 5 min. a temperatura ambiente e imediatamente lavados com 1X PBS gelado. Os parasitas fixados foram permeabilizados por 5 min com 0,1% de Triton X-100 em 1X PBS e incubados com 0,1 M glicina por 10 min. a temperatura ambiente. Em seguida os parasitas foram depositados nas lâminas tratadas com

poli-L-lisina e aí aderidos. Os parasitas aderidos foram incubados separadamente por 16 horas a 4 °C com cada um dos soros primários produzidos em coelho: anti-LaTRF, anti-LaRPA-1 anti-LaRbp38 e anti-LaTERT. Os soros primários foram preparados em uma solução contendo 4% de BSA em 1X PBS nas seguintes diluições: anti-LaRPA-1 (1:2000), anti-LaRbp38 (1:2000) anti-LaTRF (1:3000) e anti-LaTERT (1:3000). Após a incubação, a lâmina foi lavada exaustivamente com 1X PBS e os parasitas foram então incubados por 2 horas a 4 °C e na ausência de luz, com anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com Alexa 555 (Invitrogen), em uma solução contendo 4% de BSA em 1X PBS na diluição 1:4000. Após a incubação, a lâmina foi lavada exaustivamente com 1X PBS. Os parasitas foram contracolorados com DAPI em Vectashield (Vector laboratories) e em seguida as lâminas foram fechadas com lamínula e vedadas com esmalte. As imagens foram adquiridas em aumento de 100X com imersão utilizando-se microscópio de fluorescência Nikon 80i e o programa “NIS acquisition and analysis package”. Estes ensaios foram realizados pelo aluno Marcelo Santos Silva, aluno de doutorado do nosso laboratório.

3.8 Análise da co-localização subcelular das proteínas teloméricas LaRPA-1, LaRbp38, LaTRF e LaTERT de *L. amazonensis* usando Imunofluorescência Indireta (IF)

Para os ensaios de co-localização subcelular por imunofluorescência Indireta (IF), lâminas de vidro foram previamente lavadas e tratadas com 0,1% de poli-L-lisina (Sigma). 1×10^6 formas promastigotas de *L. amazonensis* de 4 dias de cultura, foram centrifugados a 2800 RPM durante 5 min., lavados com 1 ml de 1X PBS gelado e em seguida foram fixados com formalina 1% (formaldeído 36,5%) por 5 min. a temperatura ambiente e imediatamente lavados com 1X PBS gelado. Os parasitas fixados foram permeabilizados por 5 min com 0,1% de Triton X-100 em 1X PBS e incubados com 0,1 M glicina por 10 min. a temperatura ambiente. Em seguida os parasitas foram depositados nas lâminas tratadas com poli-L-lisina e aí aderidos. Após os parasitas fixados, os ensaios foram realizados em duas etapas. O

ensaio de co-localização das proteínas LaRPA-1 e LaTRF foi realizado da seguinte forma: Primeiro incubou-se os parasitas por 16h a 4 °C com soro anti-LaRPA-1, diluído 1:2000, em uma solução contendo 4% de BSA em 1X PBS. Após a incubação, a lâmina foi lavada exaustivamente com 1X PBS e os parasitas foram então incubados por 2 horas a 4 °C e na ausência de luz, com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen), diluído 1:4000 em uma solução contendo 4% de BSA em 1X PBS e em seguida lavados exaustivamente com 1X PBS. Na segunda reação, os parasitas foram incubados com soro primário anti-LaTRF diluído 1:3000, também em uma solução contendo 4% de BSA em 1X PBS. A reação seguiu-se nas mesmas condições mencionadas na primeira etapa, sendo que utilizou-se como anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com Alexa Fluor 555 (Invitrogen) na proporção 1:4000. Após as lavagens, os parasitas foram contracolorados com DAPI em Vectashield (Vector laboratories) e em seguida as lâminas foram fechadas com lamínula e vedadas com esmalte.

Para os ensaios de co-localização das proteínas LaRbp38 e LaRPA-1, as reações de imunofluorescência indireta seguiu-se nas mesmas condições mencionadas no ensaio anterior, porém na primeira etapa o anticorpo primário utilizado foi o soro anti-LaRbp38, diluído 1:2000 em uma solução contendo 4% de BSA em 1X PBS e revelado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen), na diluição 1:4000 em uma solução contendo 4% de BSA em 1X PBS. Na segunda reação, o anticorpo primário utilizado foi o soro anti-LaRPA-1, diluído 1:2000 em solução contendo 4% de BSA em 1X PBS, o qual foi revelado com anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com Alexa Fluor 555 (Invitrogen), diluído 1:4000 em uma solução contendo 4% de BSA em 1X PBS. Para os ensaios de co-localização das proteínas LaTERT e LaRPA-1, na primeira etapa utilizou-se o soro anti-LaTERT como anticorpo primário, diluído 1:3000 em uma solução contendo 4% de BSA em 1X PBS, o qual foi revelado com anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen), diluído 1:4000 em uma solução contendo 4% de BSA em 1X PBS e na segunda reação, o anticorpo primário utilizado foi o soro anti-LaRPA-1, diluído 1:2000 em uma solução contendo 4% de BSA em 1X PBS, o qual foi

revelado com anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com Alexa Fluor 555 (Invitrogen), diluído 1:4000 em uma solução contendo 4% de BSA em 1X PBS.

As imagens obtidas para estes ensaios foram adquiridas em aumento de 100X com imersão utilizando-se microscópio de fluorescência Nikon 80i e o programa “NIS acquisition and analysis package”. Estes ensaios foram realizados em colaboração pelo aluno Marcelo Santos Silva, aluno de doutorado do nosso laboratório.

3.9 Purificação de proteínas nucleares de formas promastigotas de *L. amazonensis* em coluna cromatográfica de troca iônica

Extrato de núcleo de formas promastigotas de *L. amazonensis*, contendo $1,2 \times 10^{10}$ células, obtidos de acordo com Fragaki et. al., (2007), foram submetidos à fracionamento em coluna de troca iônica DEAE Sepharose (Amersham, GE Healthcare). A coluna contendo 0,5 ml de resina DEAE Sepharose foi equilibrada com 5 volumes de coluna (2.5 ml) com tampão acetato de sódio 50 mM em 1X TMG (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, MgCl₂ 1,2 mM e Glicerol 10%). O extrato nuclear foi equilibrado no mesmo tampão e aplicado na coluna. Coletou-se o “flow through”. As eluições foram feitas com dois volume de coluna (1ml) com concentrações crescentes de acetato de sódio (100 mM, 300 mM, 600 mM 900 mM e 1M) também preparadas em 1X TMG. Os eluatos foram fracionados em géis 8% 10% e 15% SDS-PAGE e analisados por Western blot. Para tentar otimizar tais resultados, os eluatos que apresentaram mais de uma proteína sendo eluídas juntas, conforme resultados obtidos em análises de Western blot, foram juntados e utilizados em ensaios de imunoprecipitação.

4. RESULTADOS

4.1. As proteínas teloméricas LARPA-1, LaTRF, LaRbp38 e LaTERT são expressas no núcleo de formas promastigotas de *L. amazonensis*

Extratos protéicos totais e das frações nucleares foram produzidos de acordo com Sefton (2005) e Fragaki et. al., (2007), a partir de formas promastigotas em fase mid log de crescimento. Extratos contendo 1×10^7 parasita por pocinho no gel, foram fracionados em gel SDS-PAGE, seguido de Western blot revelado com os respectivos soros imunes produzidos em coelho: anti-LaRPA-1, anti-LaRbp38, anti-LaTERT e anti-LaTRF (Fig.6). Este ensaio foi realizado para se verificar a

presença das proteínas e para checar a qualidade dos extratos, já que eles foram utilizados em diversos experimentos como mostrado ao longo desta tese.

Os resultados mostraram que todas as proteínas estão presentes nos extratos totais e na fração nuclear (Fig. 6, linhas 1 e 2). A proteína LaRPA-1 (PM ~51 kDa) é uma proteína exclusivamente nuclear e parece estar implicada com eventos de replicação do DNA, pois foi encontrada se associando aos telômeros do parasita *in vivo* (Siqueira Neto et al., 2007). Podemos verificar que a proteína LaRbp38 aparece em abundância na fração total e em menor quantidade na fração nuclear. Em contraste, a proteína LaRbp38 (PM~39 kDa) pode ser encontrada no núcleo e também na fração mitocondrial onde se encontra o DNA de cinetoplasto (Fig. 6 e dados não mostrados). Sua localização nuclear parece ser dependente do ciclo celular e em algumas células é possível ver a proteína em ambas organelas, sugerindo que é uma proteína multifuncional (Perez et al., em preparação). A telomerase ou LaTERT (PM ~ 156 kDa) é uma proteína exclusivamente nuclear e é responsável pela elongação dos telômeros. Entre os protozoários tripanossomatídeos, a atividade de telomerase foi identificada em extratos semi-purificados de *L. major*, *L. tarentolae*, *T. brucei* e *T. cruzi* (Cano et al., 1999, Munoz-Jordan and Collins, 2004).). A proteína LaTRF (PM ~82.5 kDa) também é uma proteína exclusivamente nuclear como suas ortólogas, as proteínas TRF de *T. brucei* (tbTRF) e hTRF1 e hTRF2 de humanos (Li and Cross, 2005).

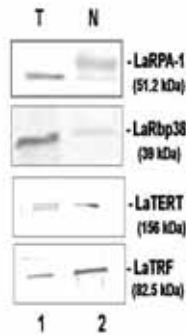


Fig. 6: Expressão das proteínas LARPA-1, LaRbp38, LaTERT e LaTRF no núcleo de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Western blotting, contendo extratos protéicos totais e da fração nuclear de formas promastigotas de *L. amazonensis* revelados com os respectivos soros imunes, como assinalado: anti-LaRPA-1 na diluição 1:1000, anti-LaRbp38 na diluição 1:1000, anti-LaTERT na diluição 1:500 e anti-LaTRF na diluição 1:250. Para estes ensaios foram depositados em cada pocinho dos géis, extratos de aproximadamente 1×10^7 células.

4.2 Confirmação da localização subcelular de LaRPA-1, LaTRF, LaRbp38 e LaTERT por imunofluorescência indireta (IF)

Resultados de ensaios de imunofluorescência indireta utilizando formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* cultivadas em fase exponencial de crescimento, foram obtidos utilizando-se como anticorpos primários os soros imunes anti-LaRPA-1, anti-LaTRF, anti-LaRbp38 e anti-LaTERT

produzidos em coelho. A localização de cada uma das proteínas nas formas promastigotas do parasita, foi obtida utilizando-se anti-IgG de coelho marcado com Alexa Flúor 555.

Os resultados apresentados nas imagens mostradas nas Figs. 7 A-D, demonstram que as proteínas LaTRF, LaRPA-1 e LaTERT aparecem quase que exclusivamente no núcleo dos parasitas enquanto a proteína LaRbp38 pode ser encontrada com maior frequência no cinetoplasto e em localização antipodal, e em menor frequência no núcleo, sendo que em algumas células, a proteína aparece em ambas organelas, confirmando nossas suspeitas anteriores (Fernández et al., 2004, Lira et al, 2007b). Estes resultados sobre a localização subcelular de LaRbp38, contradizem os resultados previamente publicados para *T. cruzi* e *T. brucei*, que mostram que os homólogos de Rbp38 nestes tripanosomatídeos tem localização exclusivamente mitocondrial. Também, foi possível notar, que a proteína LaRPA-1 é bastante abundante quando comparada as demais proteínas (por ex: LaTRF e LaTERT), sugerindo que ela cumpre diversas funções no núcleo destes parasitas.

A

B



C

D



Fig. 7: Localização subcelular das proteínas LaRPA-1, LaTRF, LaRbp38 e LaTERT no núcleo de *L. amazonensis*. Reações de imunofluorescência indireta foram realizadas utilizando-se soro anti-LaRPA-1, anti-LaTRF, anti-LaRbp38 e anti-LaTERT e anticorpo secundário Anti-IgG de coelho marcado com Alexa Fluor 555 (vermelho), como mostrado nos painéis A-D, respectivamente. Nas imagens, N, significa núcleo e K, cinetoplasto, cujos conteúdos de DNA foram corados com DAPI (azul). As imagens foram capturadas com microscópio de fluorescência Nikon 80i e a sobreposição das imagens foi realizada utilizando-se o software NIS elements.

4.3 As proteínas teloméricas LaRPA-1, LaTRF, LaRbp38 e LaTERT co-imunoprecipitam em extratos nucleares de formas promastigotas

Para tentar verificar se as proteínas teloméricas LaRPA-1, LaTRF, LaRbp38 e LaTERT interagem entre si, foram realizados ensaios de imunoprecipitação a partir de extrato nucleares contendo 2×10^9 células. As proteínas nativas foram imunoprecipitadas com o soro imune anti-LaRPA-1 produzido em camundongo. Os imunoprecipitados foram fracionados em géis SDS-PAGE e em seguida testados quanto à presença das proteínas LaRPA-1, LaTRF, LaRbp38 e LaTERT em ensaios de Western blots revelados com soros imunes específicos, segundo mostrado na Fig. 8 A. Os resultados

mostraram em extratos de núcleo imunoprecipitado com soro imune anti-LaRPA-1 produzido em camundongo, as proteínas LaTRF, LaRbp38, LaTERT são co-eluídas com a LaRPA-1 sugerindo que elas fazem parte de um mesmo complexo multiproteico (Fig. 8A). Quando extrato nucleares foram imunoprecipitados com soro imune anti-LaTRF produzido em coelho e fracionados em géis SDS-PAGE, seguido de ensaios de Western blots revelados com soros imunes específicos, verificou-se que juntamente com a proteína LaTRF são co-imunoprecipitadas as proteínas LaRPA-1 e LaRbp38 (Fig. 8B), reforçando em partes os resultados apresentados na Fig. 8A. Juntos, estes resultados preliminares sugerem que as proteínas LaRPA-1, LaTRF, LaRbp38 e LaTERT podem formar parte de um mesmo complexo protéico, onde algumas destas proteínas podem interagir fisicamente entre si.

Para verificar as possíveis interações físicas entre estas proteínas, e confirmar se algumas das quatro proteínas teloméricas que estão sendo usadas neste estudo realmente fazem parte de um complexo protéico único ou formam subcomplexos, realizamos ensaios de captura por pull-down usando resina de Níquel, como mostrado no próximo tópico.

A

B



Fig. 8. Prováveis interações entre as proteínas LaRPA-1, LaTRF, LaRbp38 e LaTERT em ensaio de imunoprecipitação com os soros anti-LaRPA-1 e anti-LaTRF utilizando extratos de núcleo de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Em A), Western blot contendo as proteínas nucleares imunoprecipitadas com soro imune anti-LaRPA-1 produzido em camundongo. As membranas foram reveladas com os soros imunes anti-LaRPA-1, anti-LaTERT, anti-LaRbp38 e anti-LaTRF produzidos em coelho. A linha 1, corresponde a 10% do extrato de núcleo (*input*, I), linha 2, corresponde a 1/5 da suspensão contendo os imunoprecipitados e linha 3, controle (C), soro imune de camundongo anti-LaRPA-1 (1/100 da quantidade usada no ensaio de imunoprecipitação). Em B), Western blot contendo as proteínas nucleares imunoprecipitadas com soro imune anti-LaTRF produzido em coelho. As membranas foram reveladas com os soros imunes anti-LaTRF, anti-LaRPA e anti-LaRb38. A linha 1, corresponde a 10% do extrato de núcleo (*input*, I), a linha 2, corresponde a 1/5 da suspensão contendo os imunoprecipitados.

1.4. Confirmação das interações proteína:proteína por ensaio de captura por *pull-down*

Neste ensaio é possível se verificar e confirmar se existe interação física entre proteínas que co-imunoprecipitam. Para realizá-lo usamos o protocolo descrito por Webb et al. (2007) que utiliza resina de Níquel como suporte e proteínas recombinantes que são expressas com cauda de histidina. Nos experimentos mostrados nas Fig. 9A-B, usou-se como isca as proteínas LaRPA-1 e LaRbp38 expressas em sistema bacteriano portando uma cauda (*tag*) de 6 x His no N-terminal (Lira et al., 2009 e Perez et al., em preparação). Como fonte de proteínas interatoras às iscas, foram usados extratos proteicos totais obtidos de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os possíveis complexos formados

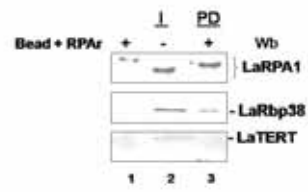
pelas proteínas interatoras de LaRPA-1 foram fracionados em géis SDS-PAGE e analisados por Western blot revelados com os soros imunes anti-LaRPA-1, anti-LaRbp38 e anti-LaTERT produzidos em coelho (Fig 9 A). Os resultados mostraram que a única proteína co-eluída com a LaRPA-1 foi a proteína LaRbp38, sugerindo uma possível interação física entre elas (Fig. 9A). É importante salientar que a proteína LaRPA-1 não interage com ela mesma, uma vez que visualizamos somente uma banda com PM ~52 kDa, que representa a proteína LaRPA-1 recombinante (Fig. 9A, linha 3, WB LaRPA-1), ou seja, a LaRPA-1 não forma homodímeros ou oligómeros.

Para o ensaio de *pull-down* utilizando a proteína recombinante LaRbp38 como isca, Western blot foram revelados com os soros imunes anti-LaRbp38, anti-LaRPA-1 e anti-LaTERT produzidos em coelho (Fig 9 B). Os resultados mostraram que as proteínas que possivelmente interagem com LaRBP38 são as proteínas LaRPA-1 e LaTERT (Fig 9B), o que sugere a existência da interação entre LaRPA-1 e LaRBP38. Aqui também é possível verificar que a proteína LaRbp38 não interage com ela mesma, já que visualizamos somente uma banda com PM ~39 kDa que representa a proteína LaRbp38 recombinante (Fig. 9B, linha 3, WB LaRbp38). Estes resultados sugerem que ocorre uma interação física entre estas três proteínas e ainda que a proteína LaRbp38 pode ser a ponte entre as proteína LaRPA-1 e proteína LaTERT neste subcomplexo proteico.

Juntos, estes resultados preliminares confirmam em parte os resultados do ensaio de imunoprecipitação com soro anti-LaRPA-1 utilizando extratos de núcleo de formas promastigotas de *L. amazonensis*, os quais mostraram que a proteína LaRbp38 e a proteína LaTERT co-imunoprecipitam com a proteína LaRPA-1. (Fig. 8A)

As interações proteína:proteína mostradas nas Figs. 8 e 9, foram confirmadas em ensaios de co-localização usando imunofluorescência indireta como mostrado nas Figs. 10 A-D.

A



B

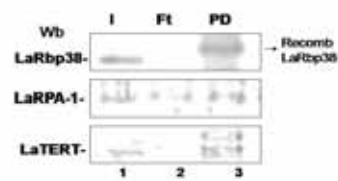


Fig. 9. Prováveis interações físicas entre as proteínas LaRPA-1, LaRbp38 e LaTERT em extratos proteicos totais de formas promastigotas de *L. amazonensis* por ensaio de pull down. Em A, Westerns blot do ensaio de captura utilizando como isca a proteína recombinante LaRPA-1, revelados com soros imunes anti-LaRPA-1, anti-LaRbp38 e anti-LaTRF produzidos em coelho. Linha 1, representa 10 ug da proteína recombinante LaRPA-1 que foi usada como ligante acoplada a resina (10% da quantidade usada no ensaio). Linha 2, corresponde a 10% do *input*, I ou extrato total de formas promastigotas de *L. amazonensis* utilizado como fonte de possíveis interatores de LaRPA-1 e linha 3, 10% da resina de Níquel contendo os possíveis complexos formados por LaRPA-1 e seus interatores. Em B, Westerns blot do ensaio de captura utilizando como isca a proteína recombinante LaRbp38, revelados com soros imunes anti-LaRbp38, anti-LaRPA-1 e anti-LaTERT produzidos em coelho. Linha 1, corresponde a 10% do *input*, I, o qual representa o extrato protéico total de formas promastigotas de *L. amazonensis* utilizado como fonte de possíveis interatores de LaRbp38. Linha 2, o filtrado ou flow trough, FT, contendo as proteínas que não interagem com a LaRbp38 e linha 3, 10% da resina de Níquel contendo os possíveis complexos formados por LaRbp38 e seus interatores.

4.5 Indícios de co-localização subcelular entre as proteínas teloméricas no núcleo de formas promastigotas de *L. Amazonensis*

Para os ensaios de co-localização celular por imunofluorescência indireta, foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* cultivadas em fase exponencial de crescimento.

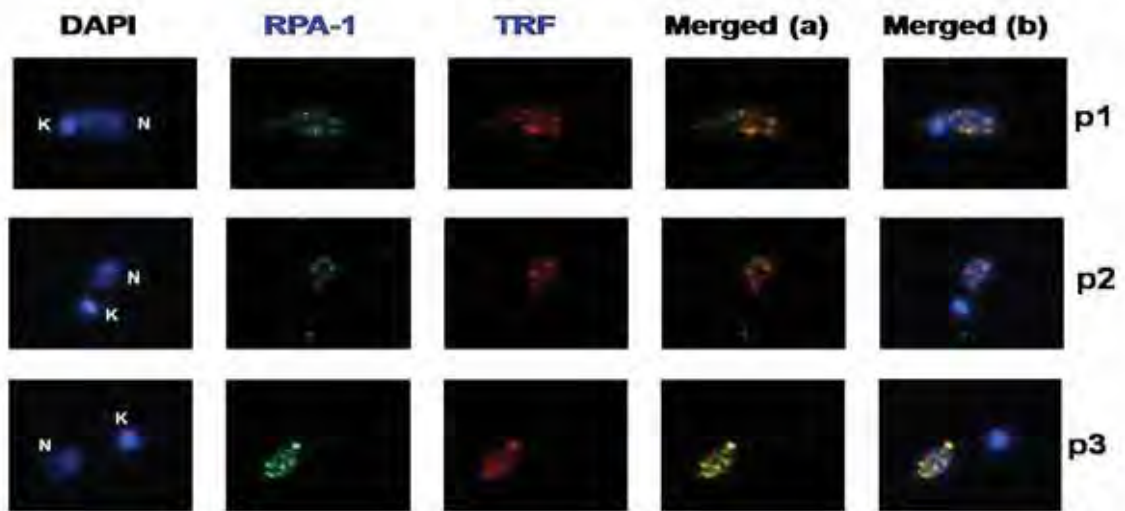
Na figura 10 A, o ensaio foi realizado da seguinte forma: para a primeira reação de imunofluorescência indireta, incubou-se os parasitas com soro imune anti-LaRPA-1 como anticorpo primário e em seguida revelou-se a proteína com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com Alexa Fluor 488 (verde) (Invitrogen). Para a segunda reação de imunofluorescência indireta, os parasitas foram incubados com anticorpo primário, soro imune anti-LaTRF, o qual foi revelado com anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com Alexa Fluor 555 (vermelho) (Invitrogen). Os resultados mostram que a proteína LaRPA parece ser mais abundante do que a proteína LaTRF nos núcleos dos parasitas (painéis 1 e 3). Também pode-se verificar a co-localização parcial das proteínas LaRPA-1 e LaTRF no núcleo dos parasitas, que correspondem a pontos amarelos na sobreposição das

imagens (merged a e b) apresentadas nos painéis 1 e 3, sugerindo que estas proteínas podem interagir uma com a outra. No painel 2 pode-se verificar que nesta célula não há co-localização das proteínas no núcleo, sugerindo que a co-localização entre LaRPA-1 e LaTRF pode ser dependente do ciclo celular.

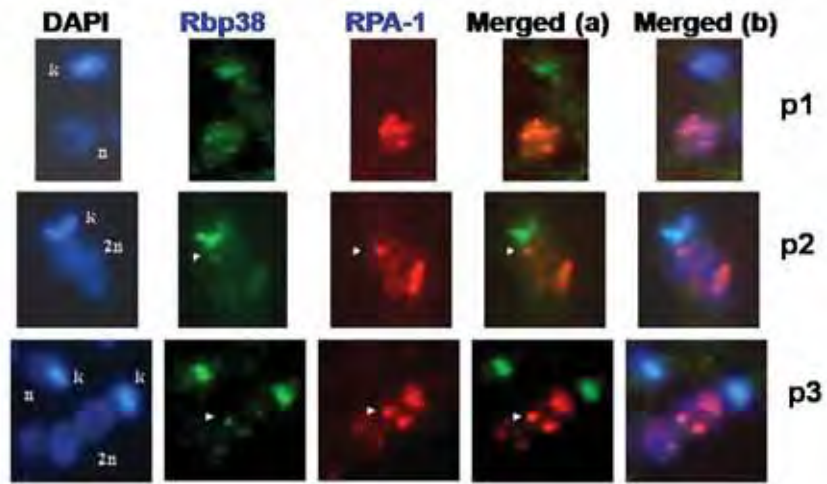
Na figura 10 B, o ensaio foi realizado da seguinte forma: para a primeira reação de imunofluorescência indireta, incubou-se os parasitas com soro imune anti-LaRbp38 como anticorpo primário e em seguida revelou-se a proteína com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com Alexa Fluor 488 (verde) (Invitrogen). Para a segunda reação de imunofluorescência indireta, os parasitas foram incubados com um segundo anticorpo primário, soro imune anti-LaRPA-1, o qual foi revelado com anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com Alexa Fluor 555 (vermelho) (Invitrogen). Os resultados mostram que à semelhança dos resultados mostrados acima, as proteínas LaRbp38 e LaRPA-1 podem tanto mostrar co-localização total (pontos amarelos no painel p1), quanto parcial (pontos amarelos nos painéis p2 e p3). Este resultado também é um indicativo que estas proteínas interagem fisicamente. Ainda nesta imagens, é possível verificar que a proteína Rbp38 localiza-se também no cinetoplasto (k) e nesta organela ela é mais abundante do que no núcleo (n).

Na figura 10 C, o ensaio foi realizado da seguinte forma: para a primeira reação de imunofluorescência indireta, incubou-se os parasitas com soro imune anti-LaTERT como anticorpo primário e em seguida revelou-se a proteína com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com Alexa Fluor 488 (verde) (Invitrogen). Para a segunda reação de imunofluorescência indireta, os parasitas foram incubados com um segundo anticorpo primário, soro imune anti-LaRPA-1, o qual foi revelado com anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com Alexa Fluor 555 (vermelho) (Invitrogen). Os resultados mostraram que as proteínas LaTERT e LaRPA-1 apresentam poucos pontos de co-localização no núcleo do parasita (pontos amarelos nos painéis p1 e p2). Estes resultados juntos reforçam em parte os apresentados nos ensaios de imunoprecipitação e nos de captura por pull-down.

A



B



C

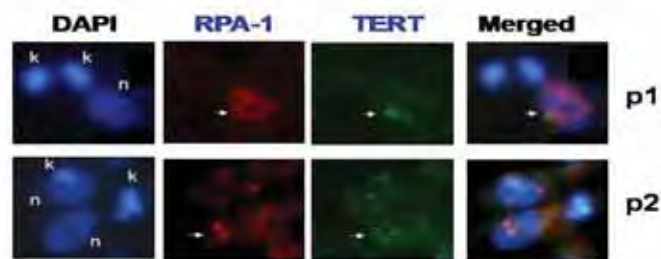


Fig. 10: Co-localização celular das proteínas teloméricas LaRPA-1, LaTRF, LaTERT e LaRbp38 no núcleo de *L. amazonensis*. Em A, a proteína LaRPA-1 é revelada com Alexa Fluor 488 (verde) e a proteína LaTRF com Alexa Fluor 555 (vermelho). Sendo a sobreposição das mesmas aparecendo como pontos brilhantes amarelo. Em B, a proteína LaRbp38 é revelada com Alexa Fluor 488 (verde) e a proteína LaRPA-1 com Alexa Fluor 555 (vermelho). Sendo a sobreposição das mesmas aparecendo como pontos brilhantes amarelo. Em C, a proteína LaTERT é revelada com Alexa Fluor 488 (verde) e a proteína LaRPA-1 com Alexa Fluor 555 (vermelho). Sendo a sobreposição das mesmas aparecendo como pontos brilhantes amarelo. Nas imagens N, significa núcleo e K, cinetoplasto, cujos conteúdos de DNA foram corados com DAPI (azul). Todas as imagens foram capturadas com microscópio de fluorescência Nikon 80i e a sobreposição das imagens foi realizada utilizando-se o software NIS elements.

4.6 As proteínas LaTRF, LaRPA-1, LaRbp38 e LaTERT co-eluem durante a purificação de extratos nucleares em coluna cromatográfica de troca iônica

Extratos de núcleo de formas promastigotas de *L. amazonensis*, produzido de acordo com Fragaki et. Al., (2007), contendo 1×10^{10} células foram submetidos a purificação em coluna

cromatográfica de troca iônica DEAE-Sepharose. As frações protéicas eluídas da coluna de DEAE com concentrações crescentes de acetato de sódio (100 mM–1 M), foram fracionadas em gel SDS-PAGE e submetidas a ensaios de Western blot revelados com os soros imunes anti-LaTRF, anti-LaRPA-1, anti-LaRbp38 e anti-LaTERT, produzidos em coelho. Os resultados mostraram que as proteínas LaTRF, LaRPA-1, LaRbp38 e LaTERT são co-eluídas com 100 mM de acetato de sódio (Fig. 11). Note também, que LaTRF, LaRPA-1 e LaRbp38, aparecem no filtrado (“flow-through”) o que indica que elas devem interagir fracamente com a resina ou então que elas podem ser eluídas com 50 mM de sal (Fig. 11, linha 2). Como todas as proteínas co-eluíram na fração contendo 100 mM de acetato de sódio, isto pode ser mais um indicador de que elas realmente façam parte de um mesmo complexo protéico no núcleo dos parasitas. Para confirmar esta hipótese, as proteínas contidas nesta fração, foram submetidas a imunoprecipitação com soro anti-LaRPA-1 como mostrado a seguir.

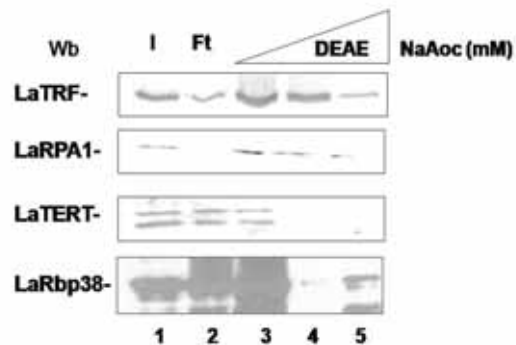


Fig. 11: As proteínas teloméricas LaTRF, LaRPA-1, LaTERT e LaRbp38 co-eluem em extratos de núcleo de formas promastigotas de *L. amazonensis* fracionados em coluna de troca iônica. Western blot do extrato de núcleo purificado em coluna de troca iônica, revelado com os soros imunes anti-LaTRF, anti-LaRPA-1, anti-LaRbp38 e anti-LaTERT, produzidos em coelho. Linha 1, corresponde ao extrato de núcleo não purificado (input, I), linha 2, ao filtrado (flow trough, FT), linha 3, corresponde ao eluato de 100 mM acetato de sódio, linha 4 ao eluato de 300 mM acetato de sódio e linha 5 ao eluato de 600 mM acetato de sódio.

4.7 Mais uma confirmação da interação física entre as proteínas teloméricas LaRPA-1 e LaRbp38 de formas promastigotas de *L. amazonensis*

Os complexos proteicos contidos na fração de 100 mM de acetato de sódio obtido da coluna de troca iônica, foram imunoprecipitados com soro anti-LaRPA-1 de camundongo, fracionados em géis

SDS-PAGE e submetidos a Western blot revelados com os soros imunes anti-LaRPA-1, anti-LaTRF, anti-LaRbp38 e anti-LaTERT produzidos em coelho. Os resultados mostraram mais uma vez que as proteínas LaRPA-1 e LaRbp38 co-immunoprecipitam (Fig, 12) e que as proteínas LaTRF e LaTERT não são co-eluídas com a LaRPA-1 neste extrato semi-purificado. Isto pode sugerir que durante a purificação do extrato foi perdido algum interator importante que liga as duas proteínas (LaTRF e LaTERT) ao complexo. Estes resultados também confirmam os anteriores, e sugerem fortemente que as proteínas LaRPA-1 e LaRbp38 interagem fisicamente.

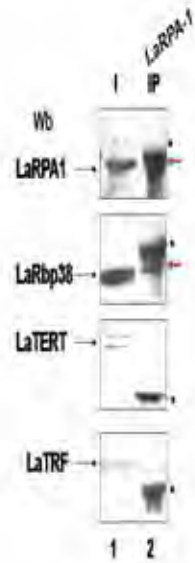


Fig. 12: As proteínas teloméricas LaRPA-1 e LaRbp38 co-imunoprecipitam em extratos de núcleo de formas promastigotas de *L. amazonensis* fracionados em coluna de troca iônica. Western blot dos complexos proteicos contidos na fração de 100 mM de acetato de sódio obtido da coluna de troca iônica após imunoprecipitação com soro imune anti-LaRPA-1 produzido em coelho. As membranas foram reveladas com os soros imunes anti-LaRPA-1 e anti-LaRbp38 produzidos em coelho. A linha 1, corresponde a 10% da fração de 100 mM de acetato de sódio (*input*, I) e linha 2, corresponde a 1/5 da suspensão contendo os imunoprecipitados.

5. RESULTADOS COMPLEMENTARES

5.1 Tentativas de isolar complexos protéicos de formas promastigotas de *L. amazonensis* por cromatografia em gel filtração

Na tentativa de demonstrar que as proteínas LaRPA-1, LaTRF, LaTERT e LaRbp38 formam parte de um mesmo complexo protéico, as proteínas contidas nos eluatos das imunoprecipitações e nos extratos brutos de cromatina foram depositadas em coluna Superdex 200 5/150 (GEHealthcare) de gel filtração utilizando-se o equipamento HPLC (AKTA PLUS).

Colunas de gel filtração funcionam como cromatografia por exclusão, promovendo uma separação seletiva das moléculas contidas no soluto, sendo essa separação com base no seu tamanho molecular. Para dar início a separação das proteínas por gel filtração, foi necessário que se calibrasse a coluna utilizando-se padrões com proteínas cujos pesos moleculares são conhecidos. A coluna foi equilibrada em tampão fosfato 0,05 M, contendo 0,15 M NaCl pH 7,0 e em seguida foi calibrada utilizando-se o kit Molecular Weight Markers (SIGMA) contendo as proteínas nas seguintes concentrações: 0,4 mg/mL de Apoferritina (443 kDa), 4 mg/ml de β - Amilase (200 kDa), 4 mg/ml de

Álcool dehydrogenase (150 kDa), 4 mg/ml de Albumina (66 kDa) e 4 mg/ml Anidrase Carbônica (29 kDa). A mistura (12,5 µl) contendo essas proteínas na concentração final de 15,04 µg, foi injetada na coluna para a obtenção do perfil de separação individual das mesmas. O perfil de eluição de cada proteína nesta separação é demonstrado pelo pico correspondente a leitura da DO_{280nm}, mostrada na Fig. 13A. Podemos notar 5 picos no cromatograma, correspondentes respectivamente às proteínas eluídas nas frações 3, 4, 5 e 6. Sendo que na fração 4 encontram-se 2 picos sobrepostos, correspondentes a eluição das proteínas β- Amilase (200 kDa) e Álcool dehydrogenase (150 kDa). Desta forma, foi realizada uma nova calibração retirando-se a proteína β- Amilase (200 kDa) da mistura. O resultado da eluição desta nova mistura de proteínas está apresentado na Fig. 13B. Pode-se notar no cromatograma a presença de 4 picos distintos correspondentes às proteínas Apoferritina (443 kDa), Álcool dehydrogenase (150 kDa), Albumina (66 kDa) e Anidrase Carbônica (29 kDa), respectivamente eluídas nas frações 5, 7, 8, 9 e 10. Portanto, este perfil de calibração foi usado como padrão nas separações de extratos protéicos como mostrado a seguir.

Extrato de cromatina livre de DNA, obtido de parasitas em fase mid-log de crescimento contendo o equivalente a 11 µg de proteínas totais foi aplicado na coluna. O perfil de eluição das proteínas contidas no extrato de cromatina está apresentado na Fig 14A. Pode-se visualizar 7 picos no cromatograma, porém para o nosso estudo foram coletadas as seguintes frações 5, 6, 7, 8, 9 e 10. Escolhemos essas frações porque elas podiam conter proteínas com peso molecular na faixa de 29 a 443 kDa. É necessário lembrar que as proteínas teloméricas que fazem parte deste estudo e que podem formar complexos de alto peso molecular, a LaTRF (82.5 kDa), LaRPA-1 (51,0 kDa) e LaRbp38 (38,0 kDa), têm juntas o peso aproximado de 171,5 kDa, o que significa que este é o tamanho mínimo de um complexo proteico formado por uma unidade de cada uma dessas proteínas. Para se verificar a presença destas proteínas ou de complexos formados pelas mesmas nas frações eluídas da coluna foram realizados ensaios de Western blot os quais foram revelados com os soros anti-LaTRF e anti-LaRPA-1. Os resultados obtidos não foram conclusivos uma vez que não se detectou nenhuma das proteínas nas

frações eluídas da coluna. Isto sugeria que estas proteínas estavam em baixa concentração no extrato de cromatina usado neste ensaio.

Em uma segunda tentativa para se verificar a formação dos complexos protéicos utilizou-se um pool de eluatos da imunoprecipitação do extrato de núcleo com soro anti-LaTRF, testado previamente por Western blotting, o qual mostrou que as proteínas LaRPA-1 e LaTRF são co-imunoprecipitadas. O cromatograma na Fig 14B mostra a presença de 3 picos sendo que o primeiro presente nas frações 1 e 2 corresponde ao void volume. O segundo pico presente nas frações 11 e 12 corresponde a proteínas com peso molecular abaixo de 29 kDa. Já o terceiro pico presente na fração 16 representa uma pausa no sistema de cromatografia, quando foram colocados novos tubos para a continuação da coleta das frações. Sendo assim, o único pico que poderia indicar a presença de complexos protéicos de alto peso molecular, seria o correspondente ao void volume, sugerindo que o tamanho estimado desses complexos deve ultrapassar o limite de separação da coluna.

Como essa tentativa de isolar possíveis complexos protéicos de alto peso molecular através de cromatografia de gel filtração não foi bem sucedida, escolheu-se uma nova estratégia para tentar isolar tais complexos protéicos.

A

B

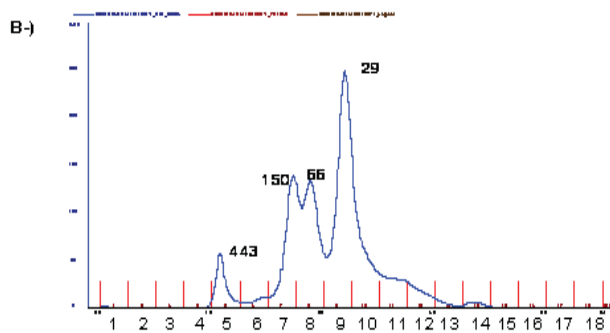
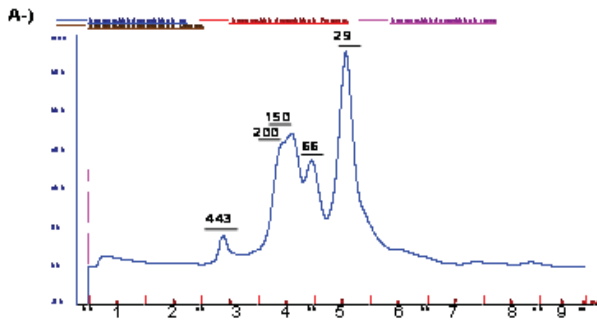


Fig. 13: Calibração da coluna Superdex 200 5/150 – GEHealthcare no sistema HPLC (AKTA, Plus), utilizando o programa Unincor. A) Cromatograma da mistura de proteínas utilizada para a calibração: 0,4 mg/mL de Apoferritina (443 kDa), 4 mg/ml de β - Amilase (200 kDa), 4 mg/ml de Álcool dehydrogenase (150 kDa), 4 mg/ml de Albumina (66 kDa) e 4 mg/ml Anidrase Carbônica (29 kDa). B-) Cromatograma da mistura de proteínas utilizada para a calibração: 0,4 mg/mL de Apoferritina (443 kDa), 4 mg/ml de Álcool dehydrogenase (150 kDa), 4 mg/ml de Albumina (66 kDa) e 4 mg/ml Anidrase Carbônica (29 kDa). No eixo X estão as frações eluídas da coluna e no eixo Y a leitura da DO_{280nm} de cada fração. Os números indicados acima de cada um dos picos correspondem ao peso molecular de cada proteína em kDa e os números indicados abaixo correspondem ao número de frações. O fluxo e a pressão imposta na coluna foi de 0,3 e 1,5 Pa, respectivamente.

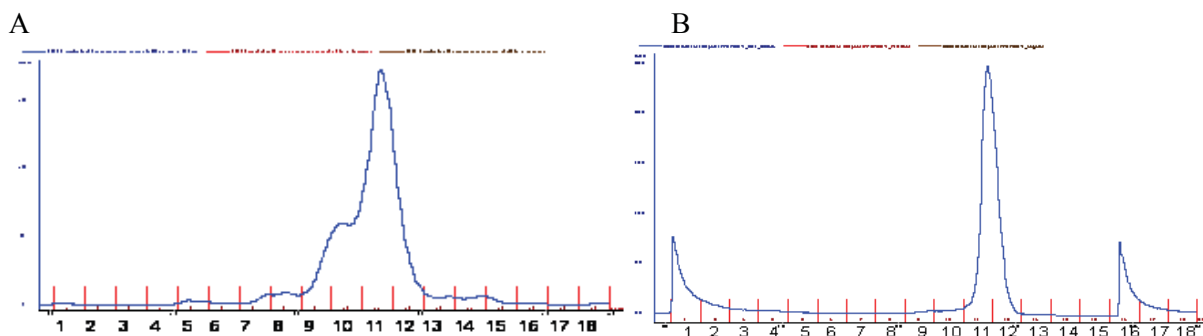


Fig. 14: Perfil de separação de extrato de cromatina de formas promastigotas de *L. amazonensis* e de eluatos de imunoprecipitação em coluna Superdex 200 5/150 (GEHealthcare). A) Foram aplicados na coluna extrato de cromatina de formas promastigotas de *L. amazonensis*, tratados com DNase I. B) Foram aplicados na coluna pool de eluatos da imunoprecipitação de extrato de núcleo com soro anti-LaTRF. No eixo X estão as frações eluídas da coluna e no eixo Y a leitura da DO_{280nm} de cada fração. O fluxo e a pressão imposta na coluna foi de 0,3 e 1,5 Pa, respectivamente.

5.2 As proteínas teloméricas LaTRF e LaRPA-1 são expressas no núcleo de formas amastigotas de *L. amazonensis*

Para confirmar se as proteínas LaTRF e LaRPA-1 são expressas nas duas fases de desenvolvimento do parasita, foram obtidos extratos nucleares de formas amastigotas isoladas de patas de camundongo Balb/C infectados experimentalmente e extratos nucleares de formas promastigotas. Os resultados preliminares mostraram que as proteínas LaTRF e LaRPA-1 são expressas em extratos de núcleos obtidos tanto na forma promastigotas quanto amastigotas, indicando que tais proteínas são expressas em ambas fases de desenvolvimento do parasita. (Fig. 14A-B, linha 1 e 2).

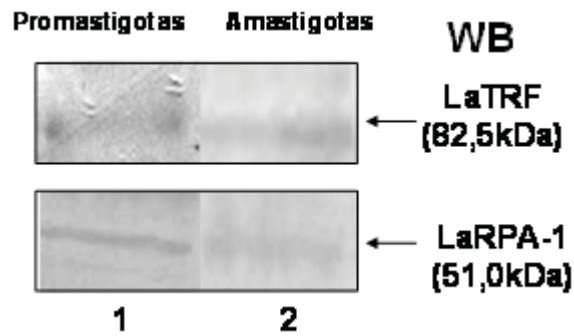


Fig. 14: Expressão de LaTRF e LaRPA-1 no núcleo de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Extratos protéicos nucleares obtidos a partir de 3×10^9 e 5×10^8 parasitas nas formas promastigotas e amastigotas, respectivamente, de *L. amazonensis* foram fracionados em gel SDS-PAGE 10% e em seguida submetidos a Western blottings revelados com os soros de coelho anti-LaTRF (A) e anti-LaRPA-1 (B).

6. DISCUSSÃO

É sabido que a estrutura telomérica em diferentes eucariotos é coordenada por proteínas que participam do complexo nucleoprotéico de ordem maior que regula a manutenção dos telômeros através

de diferentes associações (Smogorzewska & de Lange, 2004; Palm e de Lange, 2008; Dmitriev et al., 2003). Entre estas proteínas, encontram-se as exclusivamente teloméricas (que interagem com a dupla fita ou com a simples fita rica em G) e as proteínas associadas a essas proteínas teloméricas e outros fatores, como os que compõem a maquinaria de reparo a danos no DNA (Longhese, 2008; Palm e de Lange, 2008).

Dado que os telômeros de diversos organismos desempenham o mesmo papel essencial na manutenção dos cromossomos, era de se esperar que as proteínas teloméricas fossem altamente conservadas entre os eucariotos (Linger & Price, 2009; Bianchi & Shore, 2008). No entanto, a comparação entre sequências de aminoácidos de várias proteínas revelou que essa conservação por similaridade de sequência não acontece. Porém, análises estruturais das proteínas teloméricas de levedura, humanos, protozoários, revelou a presença de domínios de ligação ao DNA conservados nessas proteínas, como exemplo, os domínios *OB fold* e *Myb-like* (Linger & Price, 2009). O domínio *OB fold* é característico das proteínas que interagem com a simples fita telomérica e que fazem interação proteína:proteína, respectivamente como as proteínas POT1, CDC13, RPA e as interatoras STN1 e TEN1 (Jacobs et al., 1999; Shakirov et al., 2009; Nugent et al., 1996; Anderson et al., 2002). Já o domínio *Myb-like* é comumente encontrado nas proteínas que interagem com a dupla fita telomérica como é o caso das proteínas TRF, TAZ1 e RAP1 de mamíferos e leveduras (Dmitriev et al., 2003; Gilson & Gelli, 2007). Estes achados indicam que apesar da falta de similaridade de sequência, as proteínas teloméricas apresentam diferentes graus de conservação na estrutura e na função, tornando os telômeros estruturas de certa forma conservadas do ponto de vista evolutivo (Linger e Price, 2009).

Hoje se sabe que várias proteínas que compõe tanto o complexo telomérico *shelterin*, descrito em mamíferos, como o telossomo descrito em leveduras, ambos apresentam homólogos funcionais e compartilhados em diversos eucariotos (Dmitriev et al., 2003; Gilson & Gelli, 2007; Palm e de Lange, 2009). À exemplo disso, em mamíferos as proteínas ligantes de DNA telomérico na forma de dupla fita, TRF1 e TRF2, têm como homólogo funcional em *Saccharomyces cerevisiae* a proteína RAP1, em *Schyzosaccharomyces pombe* a proteína TAZ1, em plantas as proteínas AtTBP1-3 e AtTRP1 e em

tripanosomatídeos as proteínas TRF (Schrumppfova et al., 2004; Hwang et al., 2005; Cooper et al., 1997; Li et al., 2005, da Silva et al., 2010). Curiosamente, homólogos estruturais da proteína RAP1 de leveduras que interage com o DNA telomérico, são encontrados em humanos e tripanosomas, porém interagindo com outras proteínas e não mais com o DNA (O'Connor, 2004). As proteínas ligantes de DNA telomérico na forma de simples fita, as da família POT1 são as mais conservadas e aparecem em praticamente quase todos os eucariotos. As exceções são em *S. cerevisiae* o homólogo funcional de POT1 é a proteína CDC13 e os protozoários que não apresentam homólogos a nenhuma dessas proteínas (Lira et al., 2007a; Siqueira Neto et al., 2007; Shakirov et al., 2009).

No protozoário ciliado *Oxytricha nova*, as proteínas TBP alfa e beta interagem com a fita rica em G telomérica na forma de heterodímeros usando domínios do tipo OB *fold*. As proteínas Pot1 e TPP1 são consideradas respectivamente homólogos estruturais de TBP alfa e TBP beta (Wang et al., 2007).

Semelhante a shelterin, o complexo CST previamente descrito em leveduras e mais recentemente descrito em plantas e mamíferos, é considerado um segundo complexo protetor dos telômeros que funciona independentemente de POT1 (Miyake et al., 2009; Sun, et al., 2009; Wellinger, 2009). As proteínas CDC13, Stn1 e Ten1 são homólogos estruturais às proteínas RPA (RPA-like proteins), pois possuem vários domínios do tipo OB *fold* e interagem com uma grande variedade de DNAs na forma de simples-fita (Wellinger, 2009; Miyake et al., 2009;). Além disso, partes da proteína Stn1 pode substituir funcionalmente a subunidade 2 da RPA (Gao, 2007). Em plantas e humanos, a proteína CDC13 é substituída por Ctc-1 (*Conserved Telomere maintenance Component 1*) (Wellinger, 2009; Surovtseva et al., 2009). Portanto, em eucariotos existem dois complexos teloméricos, um que é dependente de POT1 e é denominado shelterin, e outro independente de POT1, o complexo CST, que embora pareçam redundantes (Miyake et al., 2009; Linger & Price, 2009), em humanos eles podem de fato colaborar via interação com as proteínas Stn1-TPP1 (Wan et al., 2009).

Em *Leishmania* spp., assim como em outros tripanosomatídeos não existem quase relatos sobre a formação de complexos nos telômeros desses parasitas. O único relato existente na literatura é sobre a

proteína TbRAP1, homólogo funcional da RAP1 de leveduras em *T. brucei*. A tbRAP1 aparece interagindo com os telômeros do parasita e com a proteína telomérica TbTRF, e co-localiza parcialmente com a TbTRF no núcleo dos parasitas (Yang et al., 2009). Em *Leishmania* spp., as proteínas que interagem com DNA dupla fita são as proteínas LaTBP1 (“*Leishmania amazonensis* telomere-binding protein”) considerada homólogo de Rap1 por apresentar alta similaridade de sequência com domínios *Myb-like* (Lira et al., 2007c) e proteína LaTRF que também conserva o domínio *Myb-like* e apresenta similaridade com o domínio N-terminal de homodimerização TRFH quando comparada às TRFs de humanos (da Silva et al., 2010). As proteínas descritas como ligantes de DNA telomérico na forma de simples fita são as proteínas LaRPA-1 e LaRbp38 (Lira et al., 2007b; Siqueira-Neto et al., 2007), além da telomerase (Giardini et al., 2006). LaRPA-1, é a subunidade 1 da proteína de replicação A e à semelhança de outras RPAs contém ao menos um domínio OB fold localizado no N-terminal, o qual interage especificamente in vitro e in vivo com a simples fita telomérica rica em G (Siqueira-Neto et al., 2007; Jacobs et al., 1999). A proteína LaRbp38, apesar de também interagir com a fita telomérica rica em G in vitro e in vivo, apresenta afinidades a outros DNAs, por exemplo kDNA, e também RNAs (Lira et al., 2007b). Seu domínio de interação aos diferentes DNAs está sendo descrito, porém ainda não se sabe se estruturalmente ele se parece com domínios do tipo OB fold (Perez et al., em preparação). É válido lembrar que a maioria dos protozoários, incluindo *Leishmania*, não apresentam proteínas homólogas a nenhum membro das famílias POT1 ou CDC13, o que é fortemente indicativo de que as proteínas LaRPA-1 e LaRbp38 sejam mesmo os componentes da maquinaria telomérica que interagem com a porção simples fita rica em G nos telômeros desses parasitas (Lira et al., 2007a e Siqueira-Neto et al., 2007).

Portanto, mesmo existindo diferenças notáveis na composição e na arquitetura dos telômeros de humanos, leveduras, plantas e protozoários, os princípios gerais da função das proteínas nos telômeros são os mesmos (Linger & Price, 2009). Em todos os casos os complexos teloméricos nucleoprotéicos permitem que as células diferenciem terminais cromossômicos naturais, de quebras de DNA em dupla fita. Sem a proteção dos telômeros, os terminais cromossômicos ativariam as vias de reparo de DNA as

quais sinalizariam a célula para interromper a divisão levando-a a senescência ou apoptose (Bailey et al., 1999; Boulton and Jackson, 1998). Por estas razões é de grande importância compreender os mecanismos que controlam os telômeros através das proteínas que o compõem e das interações entre elas. Uma vez conhecidas estas informações seremos capazes de interferir nas células desestabilizando seus telômeros, e conseqüentemente induzir instabilidade genômica e até os fenômenos de senescência e morte celular (Shay, 2003, Blackburn et al., 2006). Este tipo de interferência pode ser importante para se interromper o crescimento de parasitas no organismo hospedeiro podendo levar a erradicação da leishmaniose.

Neste projeto propôs dar início a identificação da formação de complexos proteicos e/ou subcomplexos nos telômeros de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Sabendo-se que a proteína TRF2 de mamíferos é componente central do complexo telomérico denominado *Shelterin* (de Lange, 2005), sendo possível que a proteína LaTRF de *L. amazonensis* interaja com diferentes proteínas teloméricas e à semelhança de seus homólogos funcionais em vertebrados, também tenha função em outras maquinarias, resolvemos primeiramente verificar as possíveis proteínas parceiras da proteína homóloga LaTRF de *Leishmania*. Porém, em vista dos resultados que foram sendo alcançados no decorrer desta tese, da hipótese de que a proteína LARPA-1 seja o representante funcional de POT1 e CDC13 e ainda considerando a evolução das informações deste tema na literatura, resolvemos incluir neste projeto a identificação de proteínas que interagem com a proteína telomérica LaRPA-1. Para alcançar esses objetivos foram utilizados ensaios in vitro de interação proteína:proteína.

Conforme os resultados obtidos ao longo desta dissertação, verificou-se que as proteínas LaRPA-1 e LaRbp38 apareceram interagindo uma com a outra e com a telomerase (LaTERT), como demonstrado nos ensaios de captura in vitro com extratos totais e ensaios de imunoprecipitação nucleares brutos e semi-purificados, todos obtidos de parasitas em fase exponencial de crescimento. Além disso, as três proteínas co-localizam parcialmente no núcleo dos parasitas. Desta forma, os resultados apresentados, embora ainda preliminares, nos permitem especular que as proteínas LaRPA-1 e LaRbp38 podem formar um complexo mínimo nos telômeros do parasita, o qual se assemelha aos

complexos CST por compartilharem com o mesmo várias características. Dentre elas, a presença de um membro da família das RPA, no caso a LaRPA-1, que contém ao menos um domínio do tipo OB fold. Uma segunda proteína, no caso a LaRBP38, que além de ligar DNA telomérico na forma de simples fita, parece ser o interator direto do complexo com a telomerase. Além destes resultados, verificou-se que as proteínas LaRPA-1 e LaRbp38 apareceram interagindo com a proteína LaTRF, porém esta interação ainda não seja compreendida e necessite de mais estudos.

Este trabalho deixa a dúvida de como estas interações representam o complexo telomérico de *Leishmania* spp. no seu todo, ou apenas a existência de distintos subcomplexos funcionais nos telômeros dos parasitas. A proposta é ampliar estes resultados com ensaios de interação proteína:proteína (ex: duplo-híbrido, captura por pull-down) utilizando-se mutantes deletionais das proteínas LaRPA-1 e LaRBP38. Também pretendemos ampliar os ensaios de imunoprecipitação utilizando uma gama maior de soros imunes e controles e descobrir novos possíveis componentes deste complexo mínimo usando análise de mistura de interatores por espectrometria de massa. E por fim tentar descobrir se algumas destas interações é dependente de alguma fase do ciclo celular fazendo estudos com culturas de parasitas sincronizados.

7. CONCLUSÕES

Na tentativa de se identificar a formação de complexos proteicos nos telômeros de *L. amazonensis* observamos que:

1. As proteínas LaRPA-1 e LaRbp38 co-imunoprecipitam junto com a proteína LaTERT em extratos de núcleares brutos e semi-purificados.
2. As proteínas LaRPA-1 e LaRbp38 interagem uma com a outra e com a proteína LaTERT em ensaios de captura in vitro.
3. As proteínas LaRPA-1 e LaRbp38 co-localizam em determinadas regiões núcleo de formas promastigotas de *L. amazonensis* em ensaios de imunofluorescência indireta.

Em geral, os resultados aqui apresentados mostraram que o objetivo central proposto como projeto para a dissertação de mestrado foi em parte alcançado.

As próximas etapas incluem a contra-prova destes resultados, onde serão realizados ensaios de imunoprecipitação dessa fração da coluna de DEAE utilizando-se os soros anti-LaRBP38, anti-LaTRF e anti-LaTERT e ensaios de captura por *pull-down* usando como isca as proteínas LaRPA-1 e LaRBP38.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAR J, CANAVATE C, GUTIERREZ-SOLAR B et al. (1997) Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. Clin. Microbiol. Rev. 1997; 10 (2): 298-319.

- ANDERSON EM, HALSEY WA, WUTTKE DS. (2002). Delineation of the high-affinity single-stranded telomeric DNA-binding domain of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc13. *Nucleic Acids Res.* 30:4305-13.
- BAILEY, S.M., MEYNE, J., CHEN, D.J., KURIMASA, A., LI, G.C., LEHNERT, B.E. & GOODWIN, E.H. (1999). DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96,14899–14904.
- BAIRD, D.M., FARR, C.J. (2006). The organization and function of chromosomes. *EMBO Rep.* 7: 372-376.
- BARRAL, A., PEDRAL-SAMPAIO, D., GRIMALDI JUNIOR, G., MOMEN, H., MCMAHON-PRATT, D., RIBEIRO DE JESUS, A., ALMEIDA, R., BADARO, R., BARRAL-NETTO, M., CARVALHO, E.M., ET AL. (1991). Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 44: 536-546.
- Basu, M. K. & Ray, M. (2005). Macrophage and Leishmania: an unacceptable coexistence. *Crit Rev Microbiol* 31, 145-154
- BIANCHI A, NEGRINI S, SHORE D. (2004). Delivery of yeast telomerase to a DNA break depends on the recruitment functions of Cdc13 and Est1. *Mol Cell.* 16:139-46.
- BILAUD, T., KOERING, C.E., BINET-BRASSELET, E., ANCELIN, K., POLLICE, A., GASSER, S.M., GILSON, E. (1996) The telobox, a Myb-related telomeric DNA binding motif found in proteins from yeast, plants and human. *Nucleic Acids Res.* 24: 1294–1303.
- BLACKBURN, E.H. (2005). Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett.*, 579: 859-862.
- BOULTON, S.J., JACKSON, S.P. (1998). Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J* 17, 1819-1828.
- BRITTO C, RAVEL C, BASTIEN P, BLAINEAU CPAGES M, DEDET JP, WINCKER P. (1998). Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene.* 222:107-17.
- BRYAN, T.M., ENGLEZOU, A., GUPTA, J., BACCHETTI, S., REDDEL, R.R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity, *EMBO J.*, 14: 4240–4248.
- BRYAN TM, REDDEL RR. (1997). Telomere dynamics and telomerase activity in in vitro immortalised human cells. *Eur J Cancer.* 33 : 767-73.
- CANO, M.I.N. (2001). Telomere biology of trypanosomatids: more questions than answers. *Trends Parasitol.*, 17: 425-429.
- CANO MI, DUNGAN JM, AGABIAN N, BLACKBURN EH. (1999). Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:3616-21.

- CHANDRA, A., HUGHES, T.R., NUGENT, C.I., LUNDBLAD, V. (2001) Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev.* 15, 404-414.
- CONTE FF, CANO MI. (2005). Genomic organization of telomeric and subtelomeric sequences of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Int J Parasitol.* 35:1435-43.
- COOPER, J., NIMMO, E., ALLSHIRE, R., CECH, T. (1997) Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature* 385, 744-747.
- CROY, J.E., WUTTKE, D.S. (2006) Themes in ssDNA recognition by telomere-end protection proteins. *Trends Biochem Sci.* 31:516-25.
- CRUZ I, NIETO J, MORENO J, CANAVATE C, DESJEUX P, ALVAR J. (2006). *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res.* 123:357-88.
- de LANGE, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telômeros. *Genes & Development*, 19:2100-2110.
- de LANGE, T. (2004). T-loops and the origin of telomeres. *Nature Reviews*, 5: 323-329.
- DEGREVE, W., FERNANDES, O., CAMPBELL, D., BOZZA, M., LOPES, U. (1994). Use of molecular probes and PCR of detection and typing of *Leishmania* – a mini review., Rio de Janeiro, vol.89 (3): 463-469.
- DMITRIEV P.V., PETROV A.V., DONTSOVA O.A. (2003). Yeast telosome complex: components and their functions. *Biochemistry*, 68: 718-734.
- EVANS, S. & LUNDBLAD, V. (1999). Est1 and cdc 13 as comediators of telomerase access. *Science*. 286: 117-120.
- FANG, G., CECH, T.R. (1993). Characterization of a G-quartet formation reaction promoted by the beta-subunit of the *Oxytricha* telomere-binding protein. *Biochemistry*, 32: 11646-11657.
- FERNÁNDEZ, M.F., CASTELLARI, R.R., CONTE, F.F., GOZZO, F.C., SABINO, A.A., PINHEIRO, H., NOVELLO, J.C., EBERLIN, M.N., CANO, M.I. (2004). Identification of three proteins that associate in vitro with the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* G-rich telomeric strand. *Eur J Biochem*, 271:3050-63.
- FU G, BARKER DC. (1998) Rapid cloning of telomere-associated sequence using primer-tagged amplification. *Biotechniques*. 24:386-90.
- GIARDINI MA, LIRA CB, CONTE FF, CAMILLO LR, DE SIQUEIRA NETO JL, RAMOS CH, CANO MI. (2006) The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: gene cloning and characterization. *Parasitol Res.* 98:447-54.
- GILSON, E. & GELLI, V. (2007) How telomeres are replicated. *Nature Rev. Mol Cell Biol.* 8, 825-838.
- GOPAL S, AWADALLA S, GAASTERLAND T, CROSS GA. (2005). A computational investigation of kinetoplast trans-splicing. *Genome Biol.* 6:R95.

GRIFFITH, J.D., COMEAU, L., ROSENFELD, S., STANSEL, R.M., BIANCHI, A., MOSS, H., DE LANGE T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, 97: 503-514.

HENDERSON, E. & BLACKBURN, E. (1993). An overhang 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol. Cell Biol.* 9: 345-34

HUG, N., & LINGNER, J. (2006) Telomere length homeostasis. *Chromosoma* 115, 413–425.

IVENS, A.C., ET AL. (genome) (2005). The Genome of the Kinetoplastid Parasite *Leishmania major*. *Science* 309(5733): 436-442

JOHNSTON, D., BLAXTER, M., DEGRAVE, W., FOSTER, J., IVENS, A., MELVILLE, S. (1999). Genomics and the biology of parasites. *BioEssays*, 21:131-147.

KAYE, M. P. and BLACKWELL, J.M. (2008) Postgenomic research on leishmaniasis: a critical self-appraisal. *Trends Parasitology* September 2008, v24. 9 : 401-405

Lang, T., Lecoeur, H. & Prina, E. (2009). Imaging *Leishmania* development in their host cells. *Trends Parasitol* 25, 464-473.

LI, B., de LANGE, T. (2003). Rap1 Affects the Length and Heterogeneity of Human Telomeres. *Mol. Biol. Cell* 14: 5060-5068.

LI, B., ESPINAL, A., CROSS, G.A. (2005). *Trypanosome* telomeres are protected by a homolog of mammalian TRF2. *Mol. Cell. Biol.*, 25: 5011-5021

LIRA, C.B.B, GIARDINI, M.A., SIQUEIRA NETO, J.L., CONTE, F.F., CANO, M.I.N. (2007a). Telomere Biology of Trypanosomatids: beginning to answer some questions. *Trends Parasitol.* In press.

LIRA, C.B.B., SIQUEIRA NETO, J.L., GIARDINI, M.A., WINCK, F.V., RAMOS, C.H.I., CANO, M.I.N. (2007b). LaRbp38: a *Leishmania amazonensis* protein that binds nuclear and kinetoplast DNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2007), doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.005.

LINGNER J, COOPER JP, CECH TR. (1995). Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science*. 269 :1533-4.

LIU, D., O'COONOR, M.S., QIN, J., SONGYANG, Z. (2004). Telosome, a Mammalian Telomere-associated Complex Formed by Multiple Telomeric Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 279:51338-51342.

LONGHESE, M. P. (2008). DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres. *Genes Dev* 22, 125-140.

KARAMYSHEVA, Z.N., SUROVTSEVA, Y.V., VESPA, L., SHAKIROV, E.V., SHIPPEN, D.E. (2004) A C-terminal Myb-extension domain defines a novel family of double-strand telomeric DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem* 279(46): 47799-807.

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

MYLER, P.J., SISK, E., MCDONAGH, P.D., MARTINEZ-CALVILLO, S., SCHNAUFER, A., SUNKIN, S.M., YAN, S., MADHUBALA, R., IVENS, A., STUART, K. (2000). Genomic organization and gene function in *Leishmania*. *Biochem. Soc. Trans.*, 28: 527-531.

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

NAKAMURA, T. M., MORIN, G. B., CHAPMAN, K. B., WEINRICH, S. L., ANDREWS, W. H., LINGNER, J., HARLEY, C. B. & CECH, T. R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*, 277: 955– 959.

NEVES, D.P. (2005). *Parasitologia Humana*. 11a Edição, Ed. Atheneu, p. 41-83.

NOGUCHI, R.C. Leishmaniose Tegumentar Americana: estudo de casos atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul durante o período de 1976 a 1999. Tese de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz/Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2001

KOWALCZYKOWSKI, S.C., Some assembly required. (2000). Nature America Inc. • <http://structbio.nature.com>

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

PEACOCK, C.S., SEEGER, K., HARRIS, D., MURPHY, L., RUIZ, J.C., QUAIL, M.A., PETERS, N., ADLEM, E., TIVEY, A., ASLETT, M., KERHORNOU, A., IVENS, A., FRASER, A., RAJANDREAM, M.A., CARVER, T., NORBERTCZAK, A., CHILLINGWORTH, T. HANCE, Z., JAGELS, K., MOULE, S., ORMOND, D. RUTTER, S., SQUARE, R., WHITEHEAD, S., RABBINOWITSCH, E., ARROWSMITH, C., WHITE, B., THURSTON, S., BRINGAUD, F., BALDAUF, S.L., FAULCONBRIDGE, A. JEFFARES, D., DEPLEDGE, D.P., OYOLA, S.O., HILLEY, J.D., BRITO, L.O., TOSI, L.R., BARRELL, B., CRUZ, A.K., MOTTRAM, J.C., PISCOPO, T.V., MALLIA, A.C. (2006). Leishmaniasis. *Postgrad Med J.* 82:649-5.

PISCOPO, T.V., MALLIA, A.C. (2006). Leishmaniasis. *Postgrad Med J.* 82:649-57.

OLIVIER, M., GREGORY, D. J. & Forget, G. (2005). Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* **18**, 293-305.

REY, L. Bases da parasitologia médica. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.199-214.

SALAS, T.R., PETRUSEVA, I., LAVRIK, O., BOURDONCLE, A., MERGNY, J.L., FAVRE, A., SAINTOME, C. (2006). Human replication protein A unfolds telomeric G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res.*, 34: 4857-4865.

SCHRAMKE, V., LUCIANO, P., BREVET, V., GUILLOT, S., CORDA, Y., LONGHESE, M. P., GILSON, E. (2004). RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends. *Nature Genetics*, 36: 46-54.

SIMPSON AG, GILL EE, CALLAHAN HA, LITAKER RW, ROGER AJ. (2004). Early evolution within kinetoplastids (euglenozoa), and the late emergence of trypanosomatids. *Protist.* 155:407-22.

SIQUEIRA NETO, J.L., LIRA, C.B.B., GIARDINI, M.A., KHATER, L., PEREZ, A.M., PERONI, L.A., DOS REIS, J.R.R., FREITAS-JUNIOR, L.H., RAMOS, C.H.I., CANO, M.I.N. (2007). *Leishmania* Replication Protein A-1 binds *in vivo* single-stranded telomeric DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2007), doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.144.

SMITH, S., DE LANGE, T. (2000). Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol.* 10(20):1299-302.

SMOGORZEWSKA, A. & DE LANGE, T. (2004). Regulation of Telomerase by Telomeric Proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 73: 177-208.

SMOGORZEWSKA, A., VAN STEENSEL, B., BIANCHI, A., OELMANN, S., SCHAEFER, M. R., SCHNAPP, G., DE LANGE T. (2000). Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol.* 20(5):1659-68.

STILES, J.K., HICOCK, P.I., SHAH, P.H. AND MEADE, J.C. (1999). Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 93: 781-807.

Sefton, B. M. (2005). Labeling cultured cells with ³²Pi and preparing cell lysates for immunoprecipitation. Unit 18.2. *Current Protocols in Molecular Biology.*: John Wiley & Sons, Inc.

SUSSEL, L. AND SHORE, D. (1991). Separation of transcriptional activation and silencing functions of the RAP1-encoded repressor/activator protein 1: isolation of viable mutants affecting both silencing and telomere length *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol 88, 7749-7753.

SHARIKOV E.V, SUROVTSEVA Y.V, OSBUN N, SHIPPEN D.E. (2005). The Arabidopsis Pot1 and Pot2 proteins function in telomere length homeostasis and chromosome end protection. *Mol Cell Biol.* 25:7725-33.

TAGGART, A.K., TENG, S.C., ZAKIAN, V.A. (2002). Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science.* Aug 9;297(5583):1023-6.

UETZ P, GIOT L, CAGNEY G, MANSFIELD TA, JUDSON RS, KNIGHT JR, LOCKSHON D, NARAYAN V, SRINIVASAN M, POCHART P, QURESHI-EMILI A, LI Y, GODWIN B, CONOVER D, KALBFLEISCH T, VIJAYADAMODAR G, YANG M, JOHNSTON M, FIELDS S, ROTHBERG JM. (2000) Comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 403, 623-627.

VAN STEENSEL, B., SMOGORZEWSKA, A., DE LANGE, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell.* 92, 401-413.

VANHAMME, L. & PAYS, E. (1995) Control of gene expression in trypanosomes. *microbiol. Rev.*, 59:223-240.

WANG F, PODELL ER, ZAUG AJ, YANG Y, BACIU P, CECH TR, LEI M. (2007) The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature.* 445:506-10.

WINCKER, P., RAVEL, C., BLAINEAU, C., PAGES, M., JAUFFRET, Y., DEDET, J.P., BASTIEN, P. (1996). The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nuc. Ac. Res.*, 24:1688-1694.

WIRTH, D. (1990). Molecular Biology of *Leishmania*. *Modern Parasite Biology*, ed. Wyler, D., Freeman, W. and Co., pp. 348-361.

WRIGHT, W.E., TESMER, V.M., HUFFMAN, K.E., LEVENE, S.D., SHAY, J.W. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev.*, 11:2801-2809.

YE JZ, DONIGIAN JR, VAN OVERBEEK M, LOAYZA D, LUO Y, KRUTCHINSKY AN, CHAIT BT, DE LANGE T. (2004) TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *J Biol Chem.* 279, 47264-71.

YU, E.Y., KIM, S.E., KIM, J.H., KO, J.H., CHO, M.H., CHUNG, I.K. (2000) Sequence-specific DNA recognition by the Myb-like domain of plant telomeric protein RTBP1. *J. Biol. Chem.* 275, 24 208 – 24 214.

XIN H, LIU D, WAN M, SAFARI A, KIM H, SUN W, O'CONNOR MS, SONGYANG Z. (2007). TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature*, 445:559-62.

ZAUG A.J., PODELL E.R., CECH T.R. (2005). Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 10864-10869.

ZHU, X.D., KUSTER, B., MANN, M., PETRINI, J.H., AND LANGE, T. (2000). Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat. Genet.* 25, 347–352.