

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – CAMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Caracterização da proteína LaRbp38: mapeamento do domínio de interação com ácidos nucleicos e identificação de possíveis proteínas parceiras

Dissertação apresentada ao Instituto de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas - Genética

Aluna: Arina Marina Perez
Orientadora: Maria Isabel Nogueira Cano.

Botucatu

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Perez, Arina Marina.

Caracterização da proteína LaRbp38: mapeamento do domínio de interação com ácidos nucléicos e identificação de possíveis proteínas parceiras / Arina Marina Perez. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2009.

Orientadora: Maria Isabel Nogueira Cano

Assunto CAPES: 20400004

1. Parasitologia - Aspectos genéticos 2. Proteínas

CDD 574.524

Palavras-chave: LaRbp38; Leishmania; Telômeros

Agradecimento:

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela vida, inspiração, saúde e força.

Agradeço a minha família, principalmente a meus pais, Ariovaldo e Georgina que muitas vezes abriram mão de tudo pela educação e formação dos filhos, sempre apoiando e dando força em minhas escolhas.

Ao meu namorado Anderson que sempre esteve do meu lado incentivando em todos os momentos nunca me deixando desanimar e desistir.

Aos meus irmãos Ana Carolina e Diego que sempre torceram por mim.

Aos amigos para todas as horas Analice, Vinicius, Bárbara e Talita

A Republica Madames 4 ever (Fernanda, Flavia, Samara e Elisa) que me acolheram tão bem em Botucatu, me fazendo sentir em casa.

Aos colegas que se tornaram amigos de laboratório Rita, Marcelo e Camila que fizeram com que a rotina do dia a dia se tornasse prazerosa, divertida, acho que posso dizer que formamos uma verdadeira equipe, onde sempre estamos prontos a ajudar uns aos outros.

Aos amigos que fiz durante minha jornada que agora estão seguindo seus caminhos do outro lado do Mundo (Mirian e Jair), que foram de extrema importância para minha formação, me ajudaram muito e agora moram no meu coração.

A todos aqueles que colaboraram em meus experimentos Tininha, Karina, Daniel.

Aos tantos colaboradores Prof Carlos Ramos, Prof. Marcos Fontes, Antônio, Prof. Ramon, Prof. Fábio Gozzo.

Aos funcionários do departamento de parasitologia, que sempre estiveram tão dispostos a me ajudar.

Ao departamento de genética por toda infraestrutura disponível para realização deste trabalho.

Agradeço em Especial a minha orientadora Maria Isabel Nogueira Cano que acreditou em minha capacidade e abriu muitas portas para meu futuro profissional, muitas vezes deixando de lado, compromissos, ficando até tarde no laboratório, trabalhando aos finais de semana e feriados para nos ajudar e que também se mostra uma grande amiga a todos nós do laboratório de telômeros, sempre pronta a qualquer hora para qualquer duvida ou problema.

Agradeço a FAPESP que sempre deu todo suporte para o desenvolvimento do meu projeto.

Glossário

BL21(DE3)RP códon plus – linhagem de bactérias utilizada para hospedar vetores pET-28a(+);

BSA: albumina sérica bovina

CDC13 – “cell division cycle 13”;

cDNA – DNA complementar;

DH5 α – linhagem de bactérias utilizada para multiplicar e manter vetores pCR[®] 2.1;

DNA – ácido desoxirribonucléico;

DNase: desoxirribonuclease A

EDTA: ácido etileno diamino tetracético

EMSA- “Electrophoretic Mobility Shift Assay”, Ensaio para mostrar interação entre proteínas e ácidos nucléicos

HIV-1 – vírus da imunodeficiência humana tipo 1;

hTR – componente RNA da telomerase de humanos;

IP – imunoprecipitação;

IPTG – isopropil- β -D tiogalactopiranosídeo;

kDa: quilo Daltons

kDNA – “kinetoplast DNA”, DNA do cinetoplasto;

LaTBP1 – “*Leishmania amazonensis* telomere binding protein 1”;

LaTel – Sequência de DNA dupla fita utilizada nos ensaios de EMSA

LaTERT – componente transcriptase reversa da telomerase de *L. amazonensis*;

LC – leishmaniose cutânea;

LCD – leishmaniose cutânea difusa;

LCTAS – “*Leishmania* conserved telomere-associated sequence”;

LMC – leishmaniose mucocutânea;

LPG – lipofosfoglicano;

LTR – repetições terminais longas;

LV – leishmaniose visceral;

OD: densidade óptica

OMS – Organização Mundial da Saúde;

pb: par de base

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PCR – reação em cadeia da polimerase

Pif1 - Petite Integration Frequency

pET-28a(+) – vetor utilizado para expressão de proteínas heterólogas em bactérias *Escherichia coli*;

POT1 – “protection of telomeres 1”;

RAP1 – “repressor/activator protein 1”;

RBP38 – “RNA binding protein 38”;

RNA – ácido ribonucléico;

RNase A – ribonuclease A;

RPA1 – “replication protein A – 1”;

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio;

T.A.: temperatura ambiente

TAE: tampão Tris-acetato-EDTA

TBE: tampão Tris-borato-EDTA

TE: tampão Tris - EDTA

Tel1- DNA telomérico simples fita rico em G usados nos ensaios de EMSA

TER – RNA da telomerase;

TERT – transcriptase reversa da telomerase;

T-loop – “loop” do telômero;

TRF1-2 - “TTAGGG repeat binding factors 1-2”

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo mapear os domínios de interação da proteína LaRbp38 (RNA binding protein 38 KD) de *Leishmania amazonensis* com ácidos nucleicos e a identificação de proteínas parceiras que formassem possíveis complexos com ela nos telômeros do parasita. LaRbp38 é uma proteína exclusiva de protozoários tripanosomatídeos, entre os quais estão os agentes etiológicos da leishmaniose, uma doença endêmica presente em diversas regiões do Brasil. Novos casos da doença vêm aumentando progressivamente, principalmente entre indivíduos imunocomprometidos e por isso a Organização Mundial da Saúde tem incentivado a busca de novos alvos para desenvolver drogas que eliminem eficazmente o parasita.

LaRbp38 é uma proteína codificada por um gene nuclear, que parece exercer diferentes funções nas maquinarias de replicação nuclear e mitocondrial. Foi primeiramente descrita como proteína estabilizadora de RNA mitocondrial e parece estar envolvida com a replicação de DNA mitocondrial. Em *Leishmania*, LaRbp38 também interage *in vivo* com DNA mitocondrial, com seqüências ricas em GT e com DNA telomérico simples e dupla fita. A análise estrutural da proteína não indica a presença de nenhum domínio canônico de interação a ácidos nucleicos. Para dar início aos experimentos, a primeira estratégia foi desenhar mutantes deletoriais da proteína de *L. amazonensis* (LaRbp38) de forma que cada um representa uma sobreposição do outro. Cada mutante, nomeados mut1, mut2, mut3, mut4 e mut5, foram subclonados em vetor de expressão bacteriano para produção de polipeptídios recombinantes. Em seguida os polipeptídios foram purificados e testados em *western blotting*, que mostra tanto LaRbp38 quanto os 5 mutantes sendo reconhecidas pelo soro anti-LaRbp38. Ensaios *in vitro* de interação proteína-DNA (EMSA), usando DNA telomérico simples fita Tel1, dupla fita LaTEL e DNA de cinetoplasto (kDNA) como ligantes, e as proteínas recombinantes LaRbp38 e os mutantes, mostraram que as proteínas recombinantes LaRbp38, mut2, mut3 e mut5 interagem com Tel1, LaTel e kDNA, além destas, o mut1 também apresenta afinidade ao kDNA e LaTel. A análise quantitativa de ensaios de competição cruzada entre essas proteínas e os três DNAs mostrou que a LaRbp38, que representa a proteína inteira, tem maior afinidade por Tel1, enquanto os mutantes mut2 e mut5 têm maior afinidade por kDNA e mut3 interage com maior afinidade com LaTel e também kDNA. Estes resultados juntos sugerem que o sítio de

ligação de LaRbp38 pode estar localizado em uma região de aproximadamente 61 aminoácidos que compreendem os resíduos de 174 a 235, que compreende os mutantes mut2, mut3 e mut5, podendo esta região estender-se em direção ao N-terminal da proteína.

Para a identificação de possíveis proteínas parceiras de LaRbp38, realizou-se ensaios de imunoprecipitação seguidos de *Western blotting* ou de análise dos eluatos por espectrometria de massa. Os ensaios de imunoprecipitação foram realizados utilizando-se soro anti-LaRbp38 e extratos nucleares do parasita. Embora preliminares, os resultados de Western blotting revelados com diferentes soros imunes, indicaram uma possível interação entre LaRbp38 e as proteínas LaRPA-1 e LaTRF, sugerindo que elas podem fazer parte de um mesmo complexo protéico no núcleo dos parasitas. A análise da composição protéica dos eluatos da imunoprecipitação, usando espectrometria de massa pelo método “shot gun”, mostraram uma lista de candidatas a proteínas que possivelmente interagem com LaRbp38, entre elas foram encontradas ribonucleases, helicases, ATPases, chaperonas entre outras.

Análise da co-localização subcelular da proteína LaRbp38 por Western blotting usando-se soro anti-LaRbp38 mostrou a presença da proteína nos extratos de núcleo, mitocôndria e citoplasma, sugerindo que LaRbp38 se transloca por diferentes compartimentos celulares. Por imunofluorescência indireta, a proteína foi visualizada no núcleo de algumas poucas células e na maioria das células no cinetoplasto.

Abstract

Recent results demonstrated that Rbp38 is a protein exclusively expressed in trypanosomatid parasites, which includes the genus *Leishmania*. Rbp38 is a multifunctional protein exerting functions in the kinetoplast, such as the stabilization of mitochondrial RNAs and in the nucleus, as a protein that binds *in vivo* kDNA, the double-stranded (LaTel) and the G-rich telomeric DNAs (Tel1). The trypanosomatid Rbp38 does not share sequence or functional/structural similarities with any other protein deposited in the public data bank. The present work has the aim of mapping the boundaries of the DNA-binding domain of LaRBP38, since using the available *in silico* tools, we were not able to define any known nucleic acid binding domain in this protein. Therefore, we constructed truncated overlapping mutants of LaRbp38 in order to map the boundaries of its DNA binding domain. These mutant proteins were expressed in a bacterial system and were produced in high amounts as shown by SDS-PAGE and Western blotting analyses. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were done in order to test the ability of each mutant to bind *in vitro* the G-rich telomeric DNA, double-stranded telomeric DNA and kDNA. EMSA and competition assays confirmed that LaRbp38 has at least one DNA binding domain (DBD), centrally located, between amino acid residues 141 and 235. This DBD, interacts with distinct affinities with all DNAs tested. Our results suggested that this binding domain has at least two extensions one towards the N-terminus of mut2 (aa 95 and 141), which showed binding affinity to LaTel and kDNA and other towards the C-terminus of mut3 (aa 235 to 283) that strongly interacted with kDNA. However, we can not discard that others parts of the protein may also contribute to these interactions.

Other controversial point about LaRbp38 is whether this protein has nuclear and mitochondrial subcellular localization and functions. To try to solve this issue we developed extracts from cellular fractions containing nuclear, cytoplasmic and mitochondrial proteins. These extracts were analysed by Western blotting assays revealed with anti-LaRbp38 and with anti-LaTRF. The latter, specifically recognizes LaTRF a nuclear protein that plays functions at parasites telomeres. The results showed that LaRbp38 is mainly expressed in the nuclear and mitochondrial fractions, although faint bands can be seen in the cytoplasm fraction, whereas LaTRF is exclusively expressed in the nuclear fraction. Indirect immunofluorescence

assay confirms the sub cellular localization of LaRbp38 as being predominant at the kinetoplast, although in a few cells the protein appears as slight spots in the nucleus. These results suggests that LaRbp38 translocates at the different cellular compartments probably to play specific functions in both organelles. The mechanism or factors involved in the recruitment of LaRbp38 to the nucleus or the kinetoplast remains to be described.

To help us understanding LaRbp38 cellular interactions, we developed immunoprecipitation assays using anti-LaRbp38 serum and nuclear extracts. Proteins eluted from these IP were submitted to Western blotting revealed with anti-LaRPA-1 and anti-LaTRF sera. The results showed that LaRbp38 co-immunoprecipitates with LaRPA-1 and LaTRF, which was confirmed by cross-immunoprecipitation with the anti-LaRpa-1 and anti-LaTRF followed by Western blotting revealed with anti-LaRbp38. Mass spectrometry analysis of tryptic peptides generated from nuclear proteins immunoprecipitated with anti-LaRbp38, showed that, apart of LaRbp38, proteins involved with DNA replication and intracellular transport such as helicases, topoisomerases, ribonucleases, ligases and chaperones were present in the mixture. Although these results are very preliminary, they suggest a role for LaRbp38 in DNA replication.

Rbp38 is actually considered by WHO a potential target for the development of therapies and drugs against neglected diseases.

Lista de Figuras:

Figura: 01 Formas de desenvolvimento dos parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	1
Figura: 02 Ilustração do ciclo de vida dos parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	3
Figura: 03 Diferentes formas clínicas da leishmaniose.....	6
Figura: 04 Distribuição dos casos de leishmaniose no mundo.....	7
Figura: 05 Estrutura dos telômeros.....	11
Figura: 06 Esquema mostrando a rede de interações entre as proteínas teloméricas, conhecidas como “Shelterin”.....	16
Figura: 07 Complexo telossomo de <i>S. cerevisiae</i>	17
Figura: 08 Panorama atual dos telômeros de <i>Leishmania</i>	19
Figura: 09 Mapa do vetor de expressão pET-28a.....	25
Figura: 10 Gel SDS 12% mostrando o sucesso da purificação dos oligonucleotídeos dupla fita e kDNA.....	31
Figura: 11 Diagrama mostrando a posição dos mutantes (Mut1-Mut5) em relação ao gene que codifica a proteína LaRbp38.....	34
Figura: 12 PCR de colônia mostrando o sucesso da clonagem dos mutantes 1-5 no vetor TOPO.....	35
Figura: 13 Amplificação por PCR dos insertos referentes aos mutantes (1-5) clonados no vetor pET 28 (a+).....	36
Figura: 14 Expressão dos mutantes e da LaRbp38 recombinantes.....	39
Figura: 15 Cromatogramas referentes a purificação das proteínas.....	40
Figura: 16 Proteínas recombinantes purificadas em coluna HiTrap Chelating.....	42
Figura: 17 Ensaio de Western blotting confirmando a expressão dos mutantes de LaRbp38.....	43
Figura: 18 Espectroscopia de Dicroísmo Circular.....	45
Figura: 19 Mapeamento das regiões que contém o sítio de interação com DNA em LaRbp38.....	49

Figura: 20 Porcentagem de atividade de interação de LaRbp38 e seus mutantes com as diferentes sondas testadas: Tel1, LaTel e kDNA.....	52
Figura: 21 Ensaio de Competição usando como sonda Tel1.....	53
Figura: 22 Ensaio de competição usando como sonda LaTel.....	54
Figura: 23 Ensaio de competição usando como sonda kDNA.....	55
Figura: 24 Representação esquemática mostrando os mutantes truncados construídos a partir de LaRbp38 (mut1-5) e a possível localização do domínio de interação a diferentes DNA.....	57
Figura: 25 EMSA utilizando proteínas traduzidas a partir de extratos de reticulócito de coelho....	58
Figura: 26 Proteína LaRbp38 é expressa no núcleo e no cinetoplasto de <i>L. amazonensis</i>	60
Figura: 27 Localização subcelular de LaRbp38 mostrando a proteína no cinetoplasto e no núcleo de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	61
Figura: 28 LaRbp38 pode formar parte de um mesmo complexo que contém as proteínas teloméricas LaRpa-1 e LaTRF.....	63

Lista de Tabelas:

Tabela1: Seqüência dos iniciadores usados para obtenção e seqüenciamento dos mutantes truncados e amplificação do gene <i>LaRBP38</i> inteiro.....	23
Tabela2: Seqüência correspondente a cada oligonucleotídeo usados nos ensaios de EMSA e competição.....	29
Tabela3: Resultado do seqüenciamento de nucleotídeos dos mutantes deletoriais de LaRbp38	37
Tabela4: Características de cada proteína recombinante.....	40
Tabela5: Resultados do seqüenciamento de peptídeos trípticos da proteína LaRbp38 e seus mutantes por Espectrometria de Massa (MALDI-TOF).....	48
Tabela6: Resultados das análises comparativas em banco de dados públicos e de <i>L.major</i> dos seqüenciamento dos peptídeos que compunham a mistura dos eluatos da imunoprecipitação de extrato nuclear de <i>L.amazonensis</i> com soro anti-LaRbp38.....	65

Sumário

Ficha Catalográfica	II
Agradecimentos	III
Glossário	V
Resumo	VII
Abstract	IX
Lista de figuras	XI
Lista de tabelas	XIII
1. Introdução	1
1.1 <i>Leishmania</i> e Leishmaniose.....	1
1.1.1 Ciclo de vida.....	2
1.1.2 A leishmaniose no Brasil e no mundo.....	3
1.2 A Organização do genoma e biologia molecular de parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	8
1.3 Telômeros estrutura e função.....	10
1.3.1 A replicação dos telômeros pela telomerase.....	11
1.4 Função das proteínas que se associam aos telômeros de eucariotos	14
1.5 Os telômeros de protozoários tripanosomatídeos, ênfase em <i>Leishmania</i> spp.....	17
1.6 Funções conhecidas da proteína Rbp38 de tripanosomatídeos.....	19
2. Objetivos	21
3. Metodologia	22
3.1 Cultura de parasitas.....	22
3.2 Extração de DNA genômico de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	22
3.3 Amplificação, clonagem e seqüenciamento dos mutantes truncados de LaRbpP38.....	22
3.4 Subclonagem dos fragmentos de DNA contendo os mutantes de LaRbp38 no vetor de expressão pET 28 a+.....	24

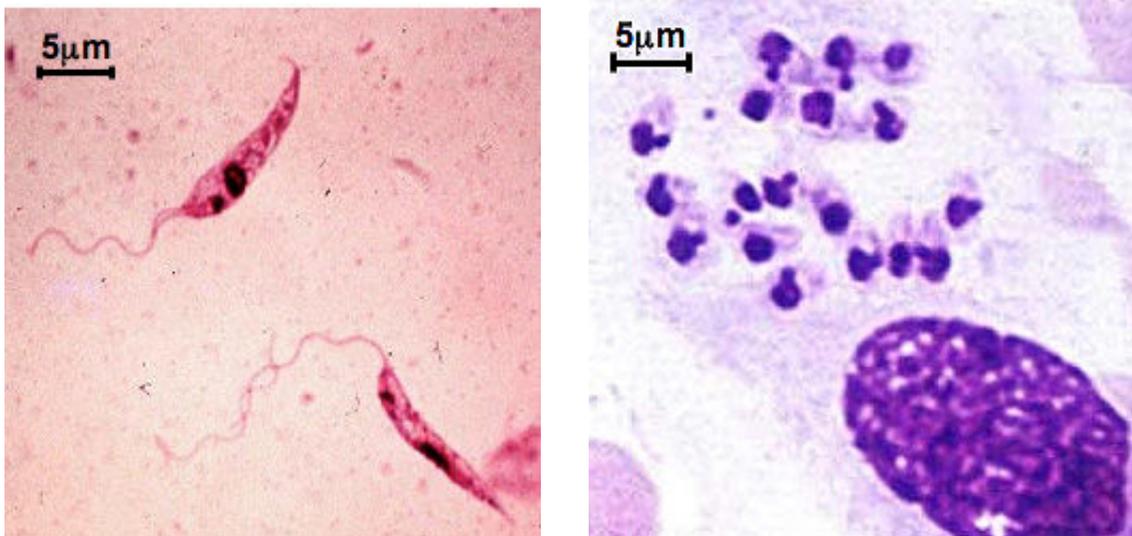
3.5	Produção e purificação das proteínas recombinantes.....	25
3.6	Análise estrutural por espectroscopia de Dicroísmo Circular.....	27
3.7	Seqüenciamento dos mutantes de LaRbp38 por espectrometria de massa.....	27
3.8	Análise da expressão de LaRbp38 e de seus mutantes por <i>Western blotting</i>	28
3.9	Mapeamento do domínio de ligação a ácidos nucleicos por ensaios de interação proteína-DNA (EMSA).....	28
3.9.1	Obtenção da do DNA telomérico na forma de dupla fita.....	29
3.9.2	Ensaio de Competição com mutantes que apresentaram interação aos DNAs testados nos ensaios de EMSA.....	30
3.9.3	Purificação de oligonucleotídeos usados nos ensaios de EMSA e competição.....	30
3.9.4	Análise quantitativa dos ensaios de interação proteína- DNA.....	31
3.10	Obtenção dos extratos totais, de núcleo e de mitocôndria para realização de <i>Western blotting</i>	32
3.11	Obtenção do soro policlonal anti-LaRbp38.....	32
3.12	Imunoprecipitação da proteína LaRbp38.....	33
3.13	Confirmação da sublocalização celular de LaRbp38 por imunofluorescência.....	33
4.	Resultados	34
4.1	Construção e clonagem dos mutantes de LaRbp38.....	34
4.2	Expressão e purificação dos mutantes e da LaRbp38.....	38
4.3	Análise da estrutura secundária das proteínas recombinantes por espectroscopia de Dicroísmo Circular.....	43
4.4	Verificação da identidade das proteínas recombinantes mutantes por espectrometria de massa.....	47
4.5	Mapeamento das regiões que contém o sítio de interação de ácidos nucleicos na proteína LaRbp38 recombinante usando mutantes deletoriais.....	48
4.6	Expressão de LaRbp38 e seus mutantes usando reticulócito de coelho.....	57
4.7	LaRbp38 é expressa no núcleo e nas mitocôndrias de <i>Leishmania amazonensis</i>	59

4.7.1 Confirmação da sub-localização celular de LaRbp38 por imunofluorescência indireta.....	60
4.8 Identificação de proteínas parceiras de LaRbp38 em extratos de núcleo de <i>L. amazonensis</i> : Resultados preliminares.....	63
5. Discussão.....	66
6. Conclusão.....	70
7. Produções Bibliográficas Complementares.....	71
7.1 Artigo 1.....	71
7.2 Artigo 2.....	72
8 . Referências Bibliográficas.....	73

1. Introdução

1.1 *Leishmania* e Leishmaniose

A Leishmaniose é uma doença infecto-contagiosa que pode ser classificada como zoonose. O agente causal dessa zoonose é um protozoário do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae, Ordem Kinetoplastida. Estes parasitas são caracterizados pela presença do cinetoplasto, uma organela rica em DNA que representa um compartimento especializado de uma única mitocôndria. Todas as espécies de *Leishmania* são heteroxênicas, ou seja, necessitam de mais de um hospedeiro durante seu desenvolvimento biológico (ciclo de vida digenético). No hospedeiro invertebrado formas promastigotas extracelulares flageladas vivem no tubo digestivo do inseto vetor, insetos hematófagos pertencentes à família Psychodidae (gênero *Lutzomyia*). (Neves, 2000; Rey, 2001). Os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos, embora as infecções sejam mais comuns em roedores e canídeos. A Fig. 1 mostra as duas formas do parasita.



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

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

Fig. 1 Formas de desenvolvimento dos parasitas do gênero *Leishmania*. **A)** Parasitas na forma promastigota, flagelada, alongada e presente no sistema digestivo do inseto hospedeiro. **B)** Parasitas na forma amastigota, aflagelada, arredondada, presente no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado.

1.1.1.Ciclo de vida

Esses parasitas apresentam ciclo de vida digenético, ou seja, necessitam de um hospedeiro intermediário para completarem seu ciclo de vida, passando por uma fase promastigota extracelular, no aparelho digestivo de insetos hematófagos dos gêneros *Lutzomyia* (novo mundo) ou *Phlebotomus* (velho mundo). A transmissão ao hospedeiro mamífero ocorre no momento da picada do mosquito fêmea contaminado com o parasita na forma promastigota metacíclico. No momento do repasto sanguíneo, a forma parasitária é inoculada na corrente sanguínea, sendo então fagocitada por células do sistema monocítico fagocitário, como os macrófagos. No vacúolo digestivo destas células, os parasitas passam por modificações morfológicas se transformando em formas amastigota, caracterizada pela ausência de flagelo, sendo exclusivamente intracelular, encontrada somente no hospedeiro mamífero. Estes amastigotas se dividem por bipartição até o momento em que ocorre a lise da célula hospedeira. Neste momento, os amastigotas caem na corrente sanguínea e são novamente fagocitados por novas células do sistema monocítico fagocitário do hospedeiro. De acordo com a espécie de *Leishmania* haverá afinidade por um determinado tipo de célula do hospedeiro, caracterizando as diferentes formas clínicas da doença. Caso um inseto sadio do gênero *Lutzomyia* ou *Phlebotomus* realize um repasto sanguíneo neste paciente infectado, poderá ingerir formas amastigotas. Ao chegarem ao intestino do inseto, o parasita novamente se diferencia em promastigota, podendo novamente infectar um novo hospedeiro mamífero no momento de um novo repasto (Neves et al., 2000, Rey, 2001). A Fig. 2 apresenta de forma esquemática o ciclo de vida do parasita.

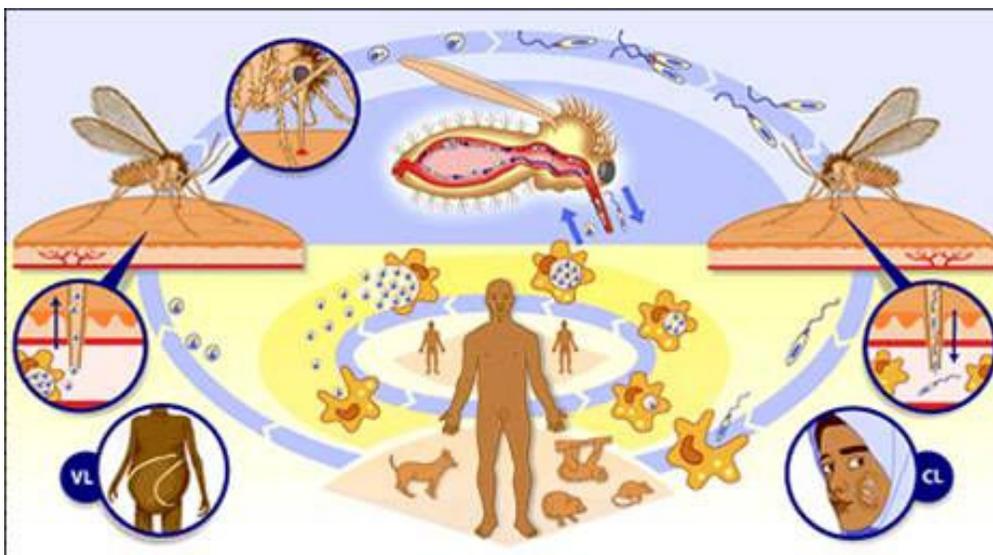


Fig. 2 Ilustração do ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania*. A metade superior da figura com fundo azul apresenta a fase do ciclo onde o parasita tem o inseto como seu hospedeiro. A metade inferior da figura com fundo amarelo apresenta a fase do ciclo em que o parasita está no hospedeiro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

Figura obtida de <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm>.

1.1.2. A leishmaniose no Brasil e no mundo

As leishmanioses eram consideradas zoonoses de transmissão essencialmente silvestre em ambientes rurais. Hoje, no entanto, apresentam mudanças no padrão de transmissão devido a modificações sócio-ambientais, como o desmatamento e o processo migratório caracterizado pelo êxodo rural, levando o homem para as periferias das grandes cidades (dados publicados pelo Ministério da Saúde em 2004). A dinâmica das leishmanioses varia de acordo com os locais de ocorrência e em função das variáveis relacionadas aos parasitos, aos vetores, aos ecossistemas e a características imunológicas dos hospedeiros (Neves et al., 2000, Rey, 2001).

Por apresentarem características clínicas e epidemiológicas diferentes em cada área geográfica, a leishmaniose foi subdividida em quatro grupos de doenças distintas: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea ou cutâneo-mucosa, leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose visceral, cujas características serão abaixo citadas (Rey, 2001). O parasita alvo deste estudo é a *L. amazonensis*, agente causal da leishmaniose cutânea e cutânea-difusa apresentando ampla distribuição geográfica (Neves, 2000; Rey, 2001). 75% de todos os casos clínicos de

leishmaniose, distribuídos por vários continentes, são do tipo cutânea, e os 25% restantes são de casos de leishmaniose visceral (Kaye e Blackwell, 2008). Porém, em algumas regiões do Brasil, *L. amazonensis* aparece como agente causal de todo o espectro da leishmaniose (Barral et al., 1991; Almeida et al., 1996).

Existe uma grande dificuldade na classificação das espécies de *Leishmania*, devido a grande semelhança morfológica entre elas (Chance 1979). Inicialmente a classificação era de acordo com os aspectos clínicos das doenças (Pessoa, 1961). Atualmente se aceita classificar as espécies que infectam o homem em complexos fenotípicos, agrupados em dois subgêneros cada qual contendo diferentes espécies (Lainson e Shaw, 1987): a) Subgênero *Viannia* (inclui: *brasiliensis*, *guyanensis*, *lainsoni*, *naifi*). b) subgênero *Leishmania* (inclui: *mexicana*, *infantum*, *amazonensis*, *enriettii*, *hertigi*).

No Novo Mundo, são reconhecidas oito espécies de *Leishmanias* responsáveis pela doença no homem (Grimaldi Jr. et al., 1989), pertencentes aos subgêneros *Viannia* (V) e *Leishmania* (L), a saber:

Leishmania* (V) *brasiliensis : causa lesões cutâneas e mucosas com ampla distribuição geográfica da América Central ao Norte da Argentina.

Leishmania* (V) *guyanensis: causa predominantemente lesões cutâneas e ocorre na parte da América do Sul, restrita à Bacia Amazônica;

Leishmania* (V) *panamensis : causa predominantemente lesões cutâneas, e ocorre na América Central e Costa Pacífica da América do Sul;

Leishmania* (V) *lainsoni : causa lesões cutâneas e ocorre no norte do Estado do Pará, na Região Amazônica do Brasil;

Leishmania* (L) *mexicana : causa lesões cutâneas e eventualmente difusas (anérgicas) e ocorre no México e América Central;

Leishmania (L) amazonensis: causa lesões cutâneas e eventualmente difusas (anérgicas) e ocorre desde a América Central até o norte, nordeste e sudeste da América do Sul;

Leishmania (L) venezuelensis: causa lesões cutâneas e ocorre na Venezuela;

Leishmania (L) chagasi: causa a forma visceral com febre, anemia, hepatoesplenomegalia, emagrecimento e ocorre do México ao norte da Argentina, com predomínio no nordeste brasileiro.

As diferentes espécies do gênero *Leishmania* produzem grande variedade de manifestações clínicas que dependem da interação entre a resposta imune do hospedeiro vertebrado e da invasividade, tropismo e patogenicidade deste parasita (Wilson & Pearson, 1990).

O conceito que se tem é que varias espécies de *Leishmania* que parasitam o homem induzem a uma doença espectral, com uma grande variação de manifestações clínicas. Pesquisas epidemiológicas indicam, porém que muitas infecções são assintomáticas ou subclínicas e que pacientes com sintomatologias maiores representam apenas uma pequena porção dos casos. A OMS (www.who.int/health_topics/leishmaniasis/) classifica as leishmanioses em quatro formas clínicas principais (Neves et al., 2000, Rey, 2001), ilustradas na figura 3:

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



Fig. 3 Diferentes formas clínicas da leishmaniose. Em A um exemplo de paciente com leishmaniose do tipo tegumentar, que pode incluir as formas cutânea e cutânea difusa. Em B leishmaniose mucocutânea. Em C um caso de leishmaniose com tropismo visceral .
Figuras obtidas em www.images.google.com (autoria desconhecida).

Mesmo apresentando grande prevalência mundial, poucos avanços foram obtidos no tratamento das leishmanioses. Os antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostan) e o antimoniato de N-methyl glucamine (Glucantime), foram introduzidos como quimioterápicos na década de 40, sendo atualmente as principais drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses, mas estes apresentam vários inconvenientes, tais como: alta cardiotoxicidade, regimes de tratamento muito prolongado e que nem sempre são efetivos. Por esses motivos, têm se incentivado estudos pós-genômicos e de genética e proteômica comparativas, para se compreender melhor a biologia destes protozoários e suas interações com seus hospedeiros. O intuito final é o descobrimento de métodos eficazes para a erradicação da doença, tais como de novos alvos parasita-específicos, desenvolvimento de vacinas e de drogas mais eficazes (Kaye e Blackwell, 2008).

De acordo com a FUNASA (Fundação Nacional de Saúde), desde 1980 a leishmaniose vem se espalhando por todas as regiões do Brasil, e dentre os 88 países que constituem regiões endêmicas para a leishmaniose, 76 são países em desenvolvimento, o que evidencia a íntima relação entre esta parasitose e os fatores sócio-econômicos dessas regiões. Estes dados demonstram a importância e a relevância de medidas sanitárias e de controle desta doença que se encontra em ascensão tanto em cães como em humanos.

São registrados cerca de dois milhões de novos casos por ano, destes, apenas 600 mil são oficialmente declarados. Um problema grave de saúde pública é o caso de co-infecção com o vírus HIV (Cruz et al., 2006). Nesta situação onde o paciente se encontra imunodeprimido, a manifestação da leishmaniose se dá de forma muito mais agressiva e severa (Piscopo e Mallia, 2006). Recentemente, pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) investigam a emergência da leishmaniose como uma importante infecção oportunista ao vírus HIV tipo 1 (HIV-1).

O impacto epidemiológico da co-infecção é tão significativo que a OMS cogita introduzir a leishmaniose visceral como doença indicadora do HIV. A associação entre leishmaniose e o HIV é recente e apresenta um número crescente de casos no Brasil e no mundo – sobretudo na região mediterrânea da Europa, que compreende Espanha, França, Itália e Portugal. Atualmente, no Brasil, os especialistas observam um fenômeno de sobreposição das infecções, caracterizado pela ruralização do HIV e pela urbanização das leishmanioses, que indica a emergência da doença parasitária como uma importante infecção oportunista ao HIV-1. Mais de 2000 casos de co-infecção em 34 países foram notificados a Organização Mundial de Saúde (OMS).

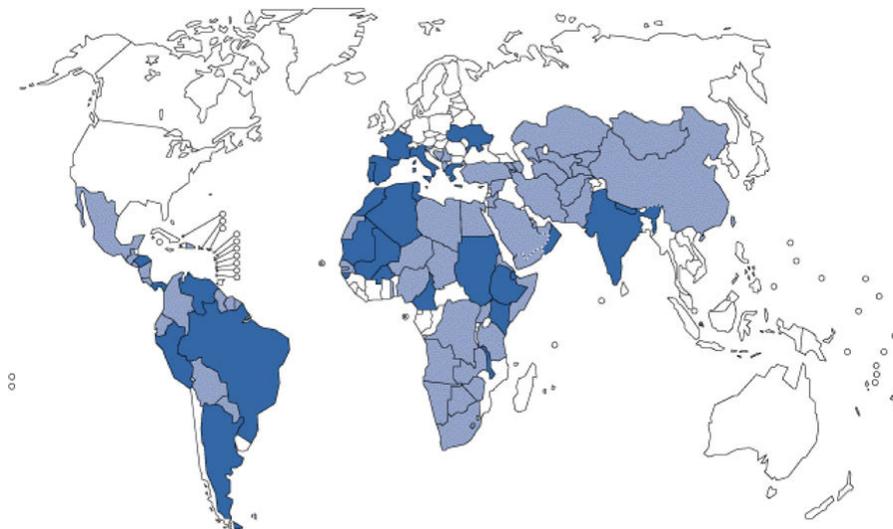


Fig. 4 Distribuição dos casos de leishmaniose no mundo. Em azul claro estão os países considerados regiões endêmicas por apresentam co-existência do parasita e do inseto vetor. Em azul escuro, países que vêm enfrentando um grave problema de co-infecção da leishmaniose com o vírus HIV com manifestação dos sintomas da SIDA (Síndrome da Imunodeficiência adquirida). (Figura obtida do site da OMS <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/strategy.htm>)

Além disso, as medidas que são empregadas para a redução da transmissão da leishmaniose, o controle dos vetores e o tratamento farmacológico da infecção acabaram induzindo o aparecimento de parasitas e vetores resistentes (Johnston et al., 1999).

No Brasil nos últimos anos, houve um aumento significativo do número de casos da doença em humanos que, quando não tratada mata até 90% dos pacientes. Em 2001, foram 2.806 infecções confirmadas no Brasil. Em 2006, esse número saltou para 4.526 casos - aumento de 61,3%. A taxa de mortalidade também subiu em um ritmo semelhante, cresceu de 169 mortes para 308 no mesmo período (82,3%). Além disso, a leishmaniose visceral está presente hoje em 20 estados no Brasil. (Dados recentes do ministério da saúde).

1.2. A Organização do genoma e biologia molecular de parasitas do gênero *Leishmania*

Os parasitas do gênero *Leishmania*, são organismos taxonomicamente primitivos, diplóides, que não apresentam ciclo sexuado de vida e cujos cromossomos se condensam durante a mitose, porém não são visíveis por microscopia ótica, o que dificulta qualquer tipo de análise citogenética. Devido ao fato da família Trypanosomatidae ter divergido muito cedo da linhagem evolutiva que deu origem aos eucariotos superiores, seus membros apresentam aspectos relacionados a organização e expressão gênica bastante peculiares (Mair *et al.*, 2000).)Entre as peculiaridades da biologia molecular destes parasitas podemos ressaltar o “trans-splicing” do RNA mensageiro, a edição de RNAs mitocondriais, a duplicação gênica e a transcrição policistrônica dos genes (Wirth, 1990).

O genoma mitocondrial, está contido em uma organela celular denominada cinetoplasto, que é composta, basicamente, por moléculas de DNA agrupadas. O DNA do cinetoplasto (kDNA) representa a informação genética mitocondrial desses parasitas e são constituído por maxicírculos e minicírculos, moléculas que se concatenam formando uma rede compacta e que têm replicação autônoma (Simpson et al., 1987; Degraeve et al., 1994). As moléculas contêm ao menos uma região conservada de 120 a 150 pares de base, razoavelmente homogênea entre os representantes de um mesmo gênero. Os maxicírculos codificam rRNA e mRNA de proteínas mitocondriais, os minicírculos representam 95% da massa de kDNA, estão em alto número de cópias e servem como

molde para a transcrição dos maxicírculos sendo bons substratos para sondas moleculares. (Simpson et al., 1987; Degraeve et al., 1994).

O tamanho do genoma nuclear haplóide é da ordem de 33-34 Mbp divididos entre aproximadamente 23-36 pares de cromossomos polimórficos (0,3 a 3,0 Mbp), os quais apresentam características espécies-específicas (Wincker et al., 1996).

No núcleo, as extremidades dos cromossomos, os telômeros, em *Leishmania*, assim como em levedura, porém diferentemente de mamíferos, formam grupamentos de número semelhante nas duas formas do parasita. A distribuição e o arranjo desses grupamentos diferem entre os núcleos de promastigotas e amastigotas e não estão concentrados na periferia do núcleo. Nas formas promastigotas, os telômeros estão randomicamente distribuídos, enquanto que nas formas amastigotas, a distribuição dos grupamentos teloméricos é mais central. Assim, especula-se que durante a transição de uma forma para outra, durante o desenvolvimento do parasita, deve ocorrer uma reorganização dos cromossomos influenciada por modificações na cromatina. Porém ainda não se sabe de que forma ocorre essa reorganização e qual a importância biológica da mesma (Dossin et al; 2008).

O recente seqüenciamento dos genomas de *Leishmania infantum* e de *L. brasiliensis*, mostraram que a composição genética dessas duas espécies apresentam poucas diferenças com o genoma de *Leishmania major*, decodificado em 2005 (Ivens et al., 2005, Peacock et al., 2007). Estudos moleculares mostraram que somente 200 dos mais de 8 mil genes que compõem o genoma desses parasitas estão distribuídos de um modo diferente, dependendo da espécie, e somente 5 genes de *L. major* estão ausentes no genoma das outras duas espécies analisadas. 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).

1.3. Telômeros estrutura e função

Telômeros são as extremidades físicas dos cromossomos lineares e são formados por DNA e proteínas. A principal função dos telômeros é proteger esses cromossomos de degradação por exonucleases e de fusões terminais, mantendo a integridade genômica e a viabilidade celular, além de garantir a completa replicação do genoma (de Lange, 2002, Johnson et al., 2002). Assim, os telômeros previnem ou controlam pelo menos quatro processos bioquímicos distintos que ocorrem no DNA telomérico *in vivo*: (1) fusão com outro telômero ou extremidade de DNA, (2) replicação das seqüências teloméricas pela telomerase, (3) degradação do DNA telomérico, e (4) recombinação nos telômeros ou em suas adjacências. Esses controles atuam para manter os telômeros funcionalmente protegidos (Blackburn, 2001).

Normalmente, os telômeros são compostos de repetições simples de nucleotídeos dispostas em *tandem*, onde se encontram associadas um conjunto de proteínas as quais são responsáveis por auxiliar no processo da replicação do DNA e por proteger as extremidades dos cromossomos formando uma estrutura em forma de capa (“cap”).

Os telômeros são formados por DNA nas formas de dupla-fita (uma fita rica em G e outra rica em C) e de simples-fita, rica em resíduos do tipo G (Chan e Blackburn, 2004, Blackburn, 2005) (Fig.5A). Esta última forma uma protrusão em direção à extremidade cromossômica que é conhecida como “3’ G-overhang” (Henderson e Blackburn, 1993, Wright et al., 1997) e a sua presença é conservada desde eucariotos unicelulares até vertebrados superiores (Myler et al., 2000). Este terminal simples-fita é capaz de assumir estruturas fechadas que são responsáveis por proteger a extremidade dos telômeros contra a maquinaria de reparo da célula e por regular o acesso da telomerase (Myler et al., 2000, Dmitriev et al., 2003, Blackburn, 2005, de Lange, 2005).

Uma dessas estruturas é o G-quadruplex, que é formado pelo “empilhamento” de tétrades de guanidina, sendo regulado pelas proteínas que se associam à simples-fita telomérica, como a POT1 e a CDC13 (Fig. 5B) (Fang e Cech, 1993, Zaug et al., 2005, Baird e Farr, 2006, Salas et al., 2006). Outra estrutura possível é o “T-loop”, ou “loop” do telômero (Figura 5B). Os “T-loops” são estabilizados por proteínas e originados pela invasão da região simples-fita na porção dupla-fita do

telômero e pela interação da porção dupla fita com proteínas teloméricas (de Lange, 2004), servindo como proteção ao final dos telômeros e impedindo o acesso da telomerase nessa região.

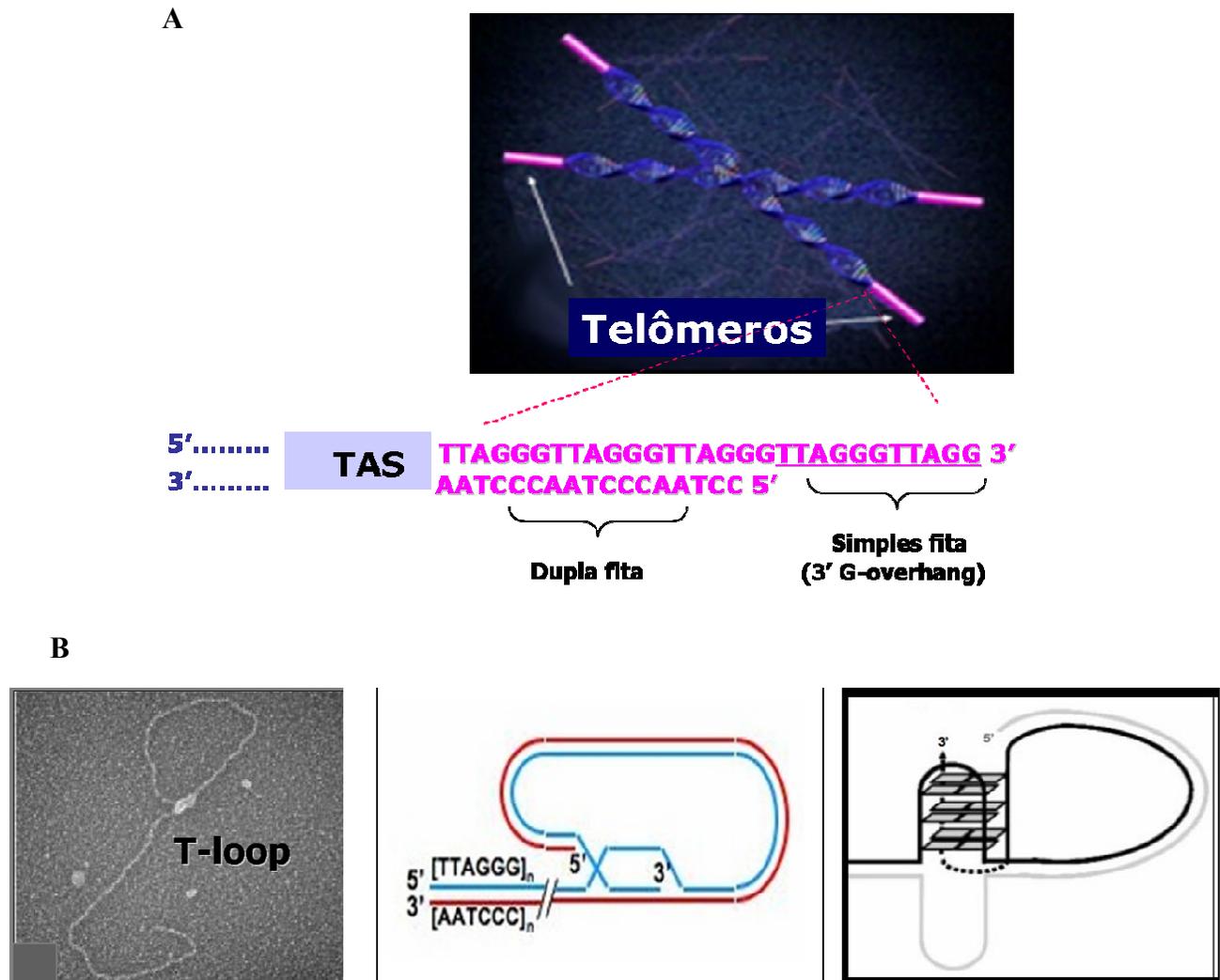


Fig. 5 Estrutura dos telômeros. A) Estrutura representando os telômeros contendo regiões dupla e simples fita. B) Microscopia eletrônica das interações teloméricas na forma de T-loop. C) Esquema de uma estrutura da formação do T-loop. **C)** Figura apresentando um possível modelo de estrutura do terminal telomérico, com formação do T-loop e G- quadruples (Figura adaptada de Oganessian e Brian, 2007)

1.3.1 A replicação dos telômeros pela telomerase

A cada evento de replicação do DNA, os telômeros estão sujeitos a perdas de seqüências de nucleotídeos que podem provocar o encurtamento destes terminais, gerando instabilidade dos

cromossomos o que favorece a instalação de fenômenos de senescência, envelhecimento celular e conseqüente morte celular (Karsfelder and Greider, 2007).

A enzima responsável pela adição específica de seqüências teloméricas durante o ciclo celular, é a telomerase, um complexo ribonucleoprotéico (RNP) que utiliza um molde de RNA intrínseco para sintetizar as repetições teloméricas nos terminais cromossômicos (Greider e Blackburn, 1989). A telomerase é quase que universalmente conservada em eucariotos, ela é composta por uma subunidade catalítica, constituída por um componente protéico semelhante a uma transcriptase reversa (TERT), por uma subunidade estrutural, constituída pelo componente RNA da telomerase (TER), que carrega o molde da repetição telomérica e por algumas proteínas associadas (Lingner et al., 1997b, Harrington et al., 2005).

A maioria dos organismos utiliza a telomerase para replicar os seus terminais cromossômicos. Estudos recentes mostram que à semelhança das leveduras, em humanos a telomerase estende diferentemente os telômeros nas fitas contínua e descontínua (Chai et al., 2006) sugerindo que existe uma interação direta entre as maquinarias de replicação do DNA e a maquinaria telomérica. Além disso, em leveduras e humanos a ação da telomerase é regulada durante o ciclo celular (Taggart et al., 2002)

A atividade da enzima já foi detectada em extratos protéicos de ciliados (Greider e Blackburn, 1989), vertebrados (Morin, 1989), leveduras (Cohn e Blackburn, 1995), plantas (McKnight et al., 1997), nemátodas (Magnenat et al., 1999), insetos (Sasaki e Fugiwara, 2000) e protozoários (Cano et al., 1999, Muñoz e Collins, 2004, Giardini et al., 2006). Sabe-se que a telomerase é normalmente ativa em organismos unicelulares, já que é requerida para a proliferação indefinida da população celular. Na maioria dos organismos multicelulares, porém, esta enzima não é expressa de forma constitutiva em todos os estágios de desenvolvimento, nem em todos os tecidos. Em humanos, por exemplo, a telomerase pode ser facilmente detectada em tumores e em células altamente proliferativas, como as células dos ovários, dos testículos e da medula óssea, sendo fortemente reprimida nas células somáticas normais (Kim et al., 1994, Riha e Shippen, 2003). Contrariamente,

em camundongos e galinhas, a atividade de telomerase pode ser detectada em todos os tecidos (Prowse e Greider, 1995, Venkatesan e Price, 1998).

Em células germinativas, células tronco embrionárias e células tronco cancerígenas, a atividade de telomerase é alta e sua expressão persistente, já algumas células tronco adultas apresentam pouca (ex: células das linhagens epidermal, epitelial ou neuronal) ou nenhuma atividade enzimática (ex: células das linhagens hematopoiética e mesenquimal). Parece que nas células tronco adultas que sofrem diferenciação, os baixos níveis de telomerase podem auxiliar nas perdas teloméricas ocorridas durante esse processo, prevenindo o encurtamento prematuro dos telômeros e a perda da função telomérica. Portanto, o tamanho dos telômeros pode ser usado como um indicador indireto da história e do potencial proliferativo dessas células. A manutenção do comprimento dos telômeros e a atividade da telomerase são processos complexos e dinâmicos que estão estreitamente ligados à regulação do ciclo celular em células tronco em humanos (Hiyama e Hiyama, 2007).

Em contraposição, nas células somáticas replicativas normais não ocorre a expressão da telomerase e os telômeros encurtam progressivamente a cada evento de mitose. Quando os telômeros atingem um tamanho muito curto, as células entram em crise e ativam vários mecanismos de “checkpoint” de ciclo celular e de reparo do DNA que resultam em fusões terminais, parada do ciclo celular, senescência e/ou apoptose (Shay e Wright, 2000, Shay e Wright, 2002). Na maioria dos casos, as células se tornam senescentes antes de se tornarem cancerosas, mas se alguma célula conseguir ultrapassar o ponto de crise e continuar se dividindo com os seus telômeros não funcionais e a sua maquinaria de reparo de DNA ativada, isso gerará instabilidade genômica e favorecerá a oncogênese (Shay e Wright, 2002, Shay e Wright, 2007). A longevidade e a progressão maligna da célula cancerosa depende da expressão da telomerase ou de outros mecanismos que auxiliem na manutenção da alta capacidade proliferativa. Assim, em quase todas as células tumorais malignas, ocorre a reativação e a expressão da telomerase em altas quantidades. É por isso que a telomerase continua a ser um alvo muito atraente para o desenvolvimento de novas terapias anti-câncer (Shay e Wright, 2002). Além disso, os telômeros e a

telomerase podem representar prognósticos plausíveis como marcadores de células tumorais (Shin et al., 2006).

1.4 . Função das proteínas que se associam aos telômeros de eucariotos

A dinâmica da estrutura telomérica é coordenada por proteínas que participam do complexo nucleoprotéico. (Smogorzewska & de Lange, 2004). Estas proteínas podem associar-se tanto a simples fita quanto a dupla fita telomérica, e formar complexos importantes para a atividade do mesmo. Geralmente, as proteínas que se associam à dupla-fita telomérica são reguladores negativos da atividade da telomerase sendo que algumas desempenham papel na manutenção da estrutura t-loop. Já as proteínas que se associam a simples-fita telomérica recrutam a telomerase para os terminais cromossômicos e regulam a frequência e o limite da elongação telomérica (Smogorzewska e de Lange, 2004, Aubert e Landsorp, 2008).

Em humanos e em outros eucariotos, por exemplo, Pot1 (“protection of telômeros”) se associa ao DNA telomérico simples fita (ssDNA) com grande afinidade, cumprindo a função direta de proteger os terminais dos cromossomos (Baumann, 2001 e Shakirov et.al, 2005). Em leveduras, é a proteína Cdc13 que cumpre função semelhante, permitindo o acesso da telomerase aos terminais cromossômicos pela sua interação direta com Est1, um componente da telomerase (Evans, S e Lundblad, V, 1999; Nugent et.al, 1996). CDC13 também participa na replicação do DNA (Bianchi e Shore, 2007) 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).

Curiosamente, a maioria dessas proteínas que interage com DNA telomérico simples fita, compartilha um domínio de ligação ao DNA do tipo “oligonucleotide-oligosaccharide fold (OB fold)”, demonstrando conservação dos mecanismos de proteção terminal em eucariotos (Mitton-Fry et.al, 2002). Por sua vez, a maioria das proteínas que sabidamente interagem com a dupla fita telomérica, possui no mínimo um domínio do tipo Myb (ou homeodomínio) originalmente descritos em proteínas c-myb de mamíferos (Hondoka et.al, 2001). Em mamíferos, *Schizosaccharomyces*

pombe e tripanosomas, a proteína TRF2 e seus homólogos funcionais Taz1 e TRF, respectivamente, se associam ao DNA telomérico como homodímero, usando um único domínio do tipo Myb localizado na porção C-terminal das proteínas (Broccoli et al., 1997, Cooper et al., 1997, Yu et al., 2000, Li et al., 2005). A proteína Rap1p de *S. cerevisiae* contém dois domínios centrais do tipo Myb e se associa ao DNA telomérico como um monômero (Konig and Rhodes, 1997). Estas proteínas atuam como reguladores negativos da manutenção dos telômeros e algumas como a TRF2 e a Taz1, estão envolvidas na formação de t-loops (Kibe et al., 2007).

A afinidade das proteínas pelo DNA telomérico é regulada por uma terceira classe de proteínas, as quais não interagem diretamente com o DNA, (ex. Rif1-Rif2/scRap1, TIN2/TRF1-TRF2), mas formam complexos de alto peso molecular com as proteínas teloméricas (Li, B e de Lange, 2003; de Lange, 2005). Em humanos, um complexo não estático denominado de “shelterina” (Fig.6) é formado por seis proteínas: TRF1, TRF2 e POT1, que interagem diretamente com o DNA e TIN2, TPP1 e RAP1, que não interagem com o DNA. No complexo shelterina, as proteínas que interagem com a simples e a dupla-fita telomérica estão conectadas por uma “ponte” protéica formada pelas proteínas TIN2 e TPP1 (O'Connor et al, 2006). 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 (Gilson e Gelli, 2007). A proteína humana TRF1 está diretamente relacionada à regulação do tamanho do telômero e ao controle do ciclo celular (Van Steensel et al., 1998, Smith e De Lange, 2000, Smogorzewska et al., 2000), enquanto TRF2 protege as extremidades teloméricas contra a maquinaria de reparo (de Lange, 2002, Griffith et al., 1999). A proteína RAP1 de leveduras está envolvida tanto no silenciamento da transcrição quanto na regulação do tamanho dos telômeros (Sussel e Shore, 1991). TIN2 desempenha um papel chave no complexo recrutando TPP1/POT1 para TRF1 e TRF2, além de ser responsável por estabelecer a interação direta entre TRF1 e TRF2, contribuindo para a estabilização de TRF2 nos telômeros (Liu et al., 2004, Ye et al., 2004, de Lange, 2005). POT1 interage exclusivamente com DNA na forma de simples-fita e desempenha além de outras funções, o importante papel de proteger a simples-fita telomérica contra degradação, impedindo fisicamente o acesso de proteínas da maquinaria de reparo (Yang et

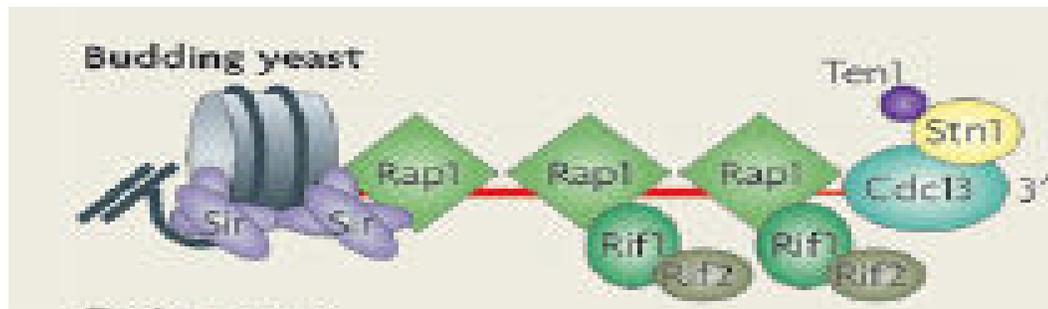


Fig. 7 Complexo telossomo de *S. cerevisiae*. DNA telomérico dupla fita, ligando proteínas Rap1, que interagem com suas parceiras Rif1 e Rif2 (*Rap1 interacting factor 1 and 2*) as quais controlam negativamente a telomerase. Cdc13 recobre a fita simples rica em G e forma um complexo com Stn1 e Ten1. Fonte: Gelli & Gilson, 2007).

1.5. Os telômeros de protozoários tripanosomatídeos, ênfase em *Leishmania* spp.

Os telômeros de Kinetoplastida, assim como os de outros eucariotos, são compostos pela repetição em *tandem* da seqüência 5'-TTAGGG-3', sugerindo mecanismos comuns básicos para a manutenção dessas estruturas (Cano, 2001). Integradas aos telômeros formando um grande complexo nucleoprotéico, estão inúmeras proteínas, responsáveis por proteger as extremidades cromossômicas da degradação por nucleases, evitar fusões entre telômeros e ainda regular o acesso da telomerase (Blackburn, 2000, Aubert and Lansdorp, 2008). Vale citar que a estrutura T-loop também já foi identificada em tripanosomatídeos (Munoz-Jordán et al, 2001).

No entanto, por se tratar de um grupo divergente dos demais eucariotos, na escala evolutiva (Simpson et al., 2004) é natural que existam particularidades na estrutura dos telômeros dos tripanosomatídeos. Particularmente no gênero *Leishmania*, evidências indicam que a estrutura e a manutenção dos terminais cromossômicos são similares aos encontrados nos telômeros da maioria dos eucariotos (Stiles et al., 1999, Cano, 2001, Lira et al., 2007a). A via de alongação dos telômeros é provavelmente telomerase dependente, visto que esta enzima já foi identificada em espécies do gênero e sua atividade também já foi verificada (Cano et al., 1999, Giardini et al., 2006). A seqüência telomérica repetitiva em *Leishmania* é a mesma encontrada em diversos eucariotos superiores: 5'-TTAGGG-3'. Algumas características particulares dos telômeros deste gênero incluem a região sub-telomérica, que pode apresentar divergências até mesmo entre espécies do

gênero. É nesta região que existem as LCTAS (*Leishmania conserved telomeric associated sequences*), que são seqüências compostas por blocos conservados. Em *L. brasilienses* existe aparentemente um único bloco de LCTAS por terminal telomérico. Já em *L. major* as LCTAS encontram-se repetidas em *tandem* e intercaladas pela seqüência telomérica (Fu e Barker, 1998). *L. amazonensis* possui as LCTAS distribuídas de maneira similar à encontrada em *L. major*. Existem ainda polimorfismos intercromossômico em relação ao número de blocos de LCTAS existentes nos telômeros de *L. amazonensis*. O número de repetições teloméricas que determina o tamanho dos telômeros também é bastante polimórfico nesta espécie (Conte e Cano, 2005). Análise dos fragmentos de restrição terminal (TRF) demonstrou que os telômeros podem variar em tamanho de 0,2 a 2,0 Kb, e diferentes cromossomos podem apresentar diferentes tamanhos o que sugere um mecanismo de regulação que atua em nível cromossômico (Conte e Cano, 2005).

O complexo protéico que compõe a cromatina telomérica em *L. amazonensis* está começando a ser determinado. Em nosso laboratório, duas proteínas foram identificadas por afinidade à simples-fita telomérica rica em “G” de *L. amazonensis* utilizando-se métodos bioquímicos. São elas as proteínas LaRbp38 (nº acesso do GenBank AY485300) e LaRPA-1 (nº acesso do GenBank AY493356), componentes dos complexos teloméricos LaGT2 e LaGT3, respectivamente (Fernández et al., 2004). Ambas interagem com os telômeros do parasita *in vivo* (Lira et al., 2007a, Siqueira Neto et al., 2007), sendo que uma delas, a LaRPA-1, apresenta um domínio do tipo OB fold característico, apresentando funções essenciais na manutenção dos telômeros. A outra proteína é a LaRbp38, cujo(s) domínio(s) de interação com ácidos nucleicos ainda não é (são) conhecido(s) (Fernández et al., 2004; Lira et al., 2007c).

Também já foram identificadas proteínas que se associam à dupla-fita telomérica desta espécie, como a LaTBP1 (Lira et al., 2007b), um homólogo de TRF2, denominado LaTRF (Silva et al., em preparação) e a proteína LaRbp38, que pode estar presente ao longo de todo o telômero (Lira et al.; 2007c) além da enzima telomerase responsável pela alongação dos terminais cromossômicos (Cano et al., 1999; Giardini et al., 2006).

A Fig. 8 mostra o panorama atual sobre a constituição protéica e organização dos telômeros de *Leishmania*.

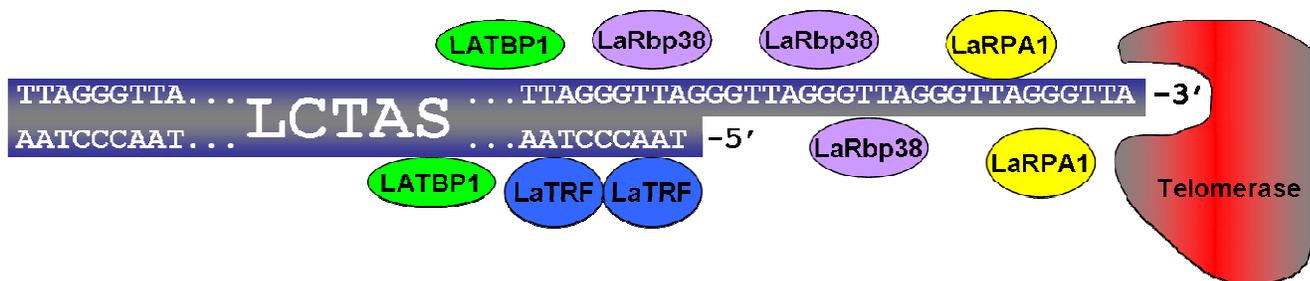


Fig. 8 Panorama atual dos telômeros de *Leishmania*. Em azul escuro está representado o DNA telomérico, composto por uma porção dupla-fita, formado pela repetição TTAGGG em *tandem*, as seqüências subteloéricas (“*Leishmania* Conserved Telomere Associated Sequences”) e a protrusão 3’G-overhang. As formas 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-1e telomerase.

1.6. Funções conhecidas da proteína Rbp38 de tripanosomatídeos

A primeira descrição sobre a proteína Rbp38 (Sbicego et al., 2003), mostra que em *L. tarentoale* e *T. brucei* ela provavelmente funciona como ligante e estabilizadora de RNA simples e dupla fita nas mitocôndrias dos parasitas, embora em sua seqüência primária e por predição *in silico*, ela não apresente nenhum domínio conhecido de ligação a RNA. Esta proteína é codificada por um gene nuclear, e parece ser conservada somente entre protozoários da família dos tripanosomatídeos, pois não existem homólogos conhecidos nos bancos de dados públicos. Posteriormente, Rbp38 foi isolada de *L. amazonensis* a partir de extratos nucleares purificados em coluna cromatográfica de afinidade, cujo ligante era a seqüência telomérica rica em G. Ela foi isolada como o componente protéico do complexo telomérico LaTG2, e posteriormente identificada por espectrometria de massa e seqüenciamento de novo, como Rbp38 (Fernández et al., 2004). Rbp38 de *L. amazonensis* (LaRbp38) é capaz de interagir *in vitro* com o DNA telomérico simples fita rico em G, demonstrando alta afinidade por uma seqüência de RNA cognata a essa fita telomérica de *Leishmania* (Fernández et al., 2004). Em trabalho recente em nosso laboratório, foi possível mostrar que LaRbp38 interage *in vivo* com DNA telomérico na forma de dupla fita e na forma de simples fita, DNA microsatélite rico

em GT e com kDNA (Lira et al., 2007c). LaRbp38 também foi descrita como apresentando 70% de identidade a uma outra proteína de *Trypanosoma cruzi*, denominada de Tc38. Esta última é uma proteína nuclear de 38 kDa que reconhece seqüências poli [dT-dG] presentes em regiões intergênicas de *T. cruzi* (Duhagon et al., 2003).

Também foi sugerido que Rbp38 de *T. brucei* (p38), pode desempenhar um papel na replicação de minicírculos de kDNA, pois foi encontrada interagindo com a seqüência universal de mini-círculo (UMS, Universal Minicircle Sequence). Experimentos de super-expressão da proteína fusionada com GFP mostram que a Rbp38 de *T. brucei* tem localização mitocondrial e nenhuma proteína foi detectada no núcleo do parasita (Liu et al 2007). Em conjunto, estes resultados sugerem que a proteína Rbp38 pode ter função tanto mitocondrial quanto nuclear, o que a torna um alvo interessante e promissor para o desenvolvimento de drogas que ataquem exclusivamente protozoários tripanosomatídeos.

2. Objetivos

O objetivo principal deste projeto foi mapear os domínios estruturais/funcionais da proteína LaRbp38 de *Leishmania amazonensis* e encontrar possíveis proteínas parceiras de LaRbp38. Para tal propôs-se o que se segue:

1. Construção de mutantes deletionais expressando diferentes fragmentos da proteína, de forma que o desenho destes mutantes representasse as diferentes porções da mesma. Produção e purificação de proteínas recombinantes utilizando-se sistema bacteriano e análise da estrutura secundária das proteínas recombinantes usando dicroísmo circular.
2. Mapeamento dos domínios de interação com ácidos nucléicos, utilizando-se ensaios *in vitro* de interação proteína-DNA (EMSA, "Electrophoretic mobility shift assay").
3. Determinação da co-localização subcelular de LaRbp38 utilizando-se extratos protéicos fracionados e analisados por Western blotting e ensaios de imunofluorescência indireta.
4. Realização de ensaios de imunoprecipitação para identificação de possíveis proteínas parceiras de LaRbp38 utilizando-se diferentes soros imunes e extratos nucleares do parasita e análise da composição protéica dos eluatos da imunoprecipitação por espectrometria de massa.

3. METODOLOGIA

3.1. Cultura de parasitas

Formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa MHOM/BR/73/M2269, foram cultivadas em fase exponencial a 27°C em meio “199” (Cultilab) pH 6,5, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e 1X solução de Antibióticos (penicilina e estreptomicina)/Antimicótico (Anfotericina B) (Life Technologies, Gibco-BRL).

3.2. Extração de DNA genômico de formas promastigotas de *L. amazonensis*

O DNA genômico foi extraído de promastigotas originados de culturas em fase exponencial de crescimento. Os parasitas foram separados do meio de cultura por centrifugação, lavados em tampão PBS contendo 2% de glicose e sedimentados por centrifugação a 10.000 rpm por 30 segundos. Para proceder com a lise celular, os sedimentos foram suspensos em solução contendo 10 mM Tris-HCL pH 7,5, 5 mM EDTA pH 8,0, 100 mM cloreto de lítio e 0.1% Triton X-100. A mistura foi incubada por 5 min à temperatura ambiente com agitação suave, seguido de 2-3 extrações com fenol: clorofórmio (vol/vol) e fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e precipitação com etanol absoluto na presença de 0,3 M de acetato de sódio pH 5,2. Os ácidos nucléicos precipitados foram ressusensos em TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1mM pH 8,0) e tratados com 10 µg de RNase A por 15 min a 37°C, seguido de extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, precipitação do DNA com 0,3 M de acetato de sódio pH 5,2 e etanol absoluto e centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos. Os sedimentos foram lavados com 75% etanol gelado e ressusensos em tampão TE. A concentração das amostras foram medidas em espectrofotômetro.

3.3. Amplificação, clonagem e seqüenciamento dos mutantes truncados de LaRbp38

O gene que codifica LaRbp38 já encontrava-se clonado e seqüenciado no laboratório (no. acesso do genBank GI: AY485300).

Para a clonagem dos mutantes, foram desenhados iniciadores contendo seqüências específicas do gene e sítios de restrição nas suas extremidades, para facilitar a clonagem e a futura expressão (Tabela 1). A amplificação desses fragmentos foram feitas por PCR utilizando-se DNA genômico de *L. amazonensis* como molde. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose e corado com brometo de etídio. Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor de clonagem pCR[®] 2.1 – TOPO, Invitrogen[™] seguido de transformação em bactérias *Escherichia coli* cepa DH5 α . As bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo 50 μ g de ampicilina, IPTG (0.8 M) e X-Gal (20 mg/ml) para selecionar as recombinantes.

Para verificar a clonagem dos fragmentos, foram feitos PCRs de colônia. Confirmada a clonagem, foram feitas as extrações de DNAs plasmidiais em pequena escala (Perfectprep[®], Plasmid Mini - Eppendorf) para subsequente subclonagem no vetor de expressão.

As reações de seqüenciamento de cada mutante obtido, foram realizadas com a utilização do kit “Big Dye Terminator v 3.0” (Applied Biosystems), conforme recomendado pelo fabricante, e os DNAs foram seqüenciados no aparelho seqüenciador ABI 377 (Applied Biosystems). Esta atividade foi realizada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

Tabela1: Seqüência dos iniciadores usados para obtenção e seqüenciamento dos mutantes truncados e amplificação do gene *LaRBP38* inteiro.

Seqüência dos Iniciadores	Gene
Rbp38-pET_F: 5' CAT ATG CTC CGT CGC GTG 3' Rbp38-pET_R: 3' CTC GAG CTA CTG AAT GAG 5'	LaRbp38 inteira
Rbp38-pET_F: 5' CAT ATG CTC CGT CGC GTG 3' Rbp38-Nt_R: 3' CTC GAG CTA CTG CAG ATT CTC 5'	mut1
Rbp38-2_F - 5' CAT ATG GAG GCG CCG AAG 3' Rbp38-2_R - 3' CTC GAG CTA CGT TGT CGC CTC 5'	mut 2
Rbp38-3_F - 5' CAT ATG CAG TAC CCC GTT 3' Rbp38-3_R - 3' CTC GAG CTA CGG GAA CTT CCT 5'	mut3
Rbp38-Ct_F - 5' CAT ATG GGC GAC CGT CAC 3' Rbp38-pET_R: 3' CTC GAG CTA CTG AAT GAG 5'	mut 4
Rbp38-pET_F: 5' CAT ATG CTC CGT CGC GTG 3' Rbp38-2_R - 3' CTC GAG CTA CGT TGT CGC CTC 5'	mut 5

Nota: Senso (F) e anti-senso(R), As posições dos sítios de restrição *NdeI* e *XhoI* estão sublinhados em cada par de iniciador.

3.4. Subclonagem dos fragmentos de DNA contendo os mutantes de LaRbp38 no vetor de expressão pET 28 a+

Para a subclonagem em vetor pET 28 a+, os DNAs plasmidiais (pCR[®] 2.1 – TOPO) e o vetor pET 28 a+, foram digeridos com 2 enzimas de restrição, respectivamente *NdeI* e *XhoI*. Para tal, 20ng de DNA plasmidial foram digeridos com 2µl de Enzima *NdeI* (5' CATATG 3' / 3' GTATAC 5'), utilizando-se 5,0 µl de tampão para 25 µl volume final. Essa reação foi incubada por 3 horas a 37°C, logo após o DNA foi precipitado na presença de 0,3 M de acetato de sódio e etanol 100%, ficando *over night* a 20°C, quando foi centrifugado a 14.000 rpm a 4°C por 30 minutos, lavado com etanol 70% e novamente centrifugado. O DNA foi ressolubilizado em 43 µl de água e digerido com 2 µl da segunda enzima de restrição *XhoI* (5' CTCGAG 3' / 3' GAGCTC 5') com 5 µl de tampão, ficando por 3 horas a 37°C. Após a digestão a reação foi inativada a 60°C por 10 minutos e as amostras foram submetidas a um gel 0.8% de agarose e excisadas para purificação através do Kit Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf). O mesmo procedimento foi feito para o vetor pET 28 a+.

Em seguida foram feitas as ligações entre o DNA digerido purificado e o vetor pET 28 a+, usando-se aproximadamente 20ng de DNA de cada inserto e 20ng do vetor, 5 µl de tampão e 2 µl de T4 DNA ligase (Invitrogen) a reação ficou a 14°C por 16 horas.

Os produtos de ligação foram transformados em bactérias competentes *E.coli* DH5α e plaqueados em LB sólido suplementado com 50 µg de Kanamicina já que o vetor apresenta resistência a essa droga. Para verificar o sucesso da clonagem algumas colônias foram selecionadas e submetidas a PCR e posteriormente foi feita a extração do DNA plasmidial através do Kit Perfectprep[®], Plasmid Mini - Eppendorf.

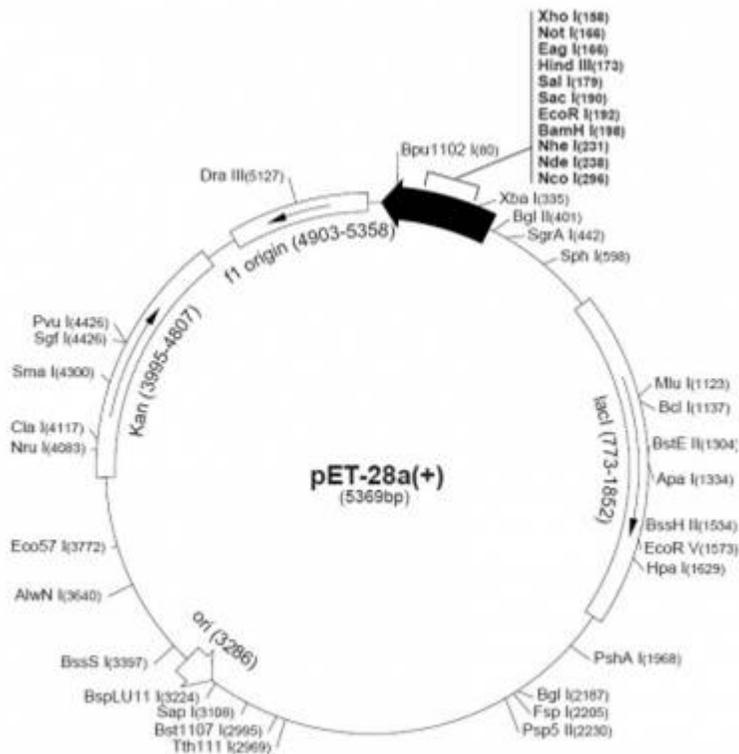


Fig.9 Mapa do vetor de expressão pET-28a-c(+)- este vetor contém origem de replicação bacteriana (ori), gene que confere resistência a kanamicina (Kan), promotor T7/lac (promotor T7 fundido ao operador do gene *lac*), possibilitando a indução da expressão da proteína recombinante por IPTG, e uma origem f1, para mutagênese e seqüenciamento.

3.5. Produção e purificação das proteínas recombinantes

Após a subclonagem, os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar bactérias competentes DH5 α e esses transformantes foram plaqueados em Meio LB sólido, contendo 50 μ g/ml de Kanamicina (já que o vetor pET 28a+ apresenta resistência a essa droga). Para os ensaios de expressão, esses recombinantes foram utilizados para transformar bactérias competentes BL21 DE3RP códon plus e os transformantes foram plaqueadas em meio LB sólido contendo 50 μ g/ml de Kanamicina e 50 μ g/ml de cloranfenicol.

Ensaio preliminares de expressão em pequena escala (100 ml de cultura) mostraram que todas as proteínas recombinantes eram expressas após 4 h de indução com 1mM de IPTG (dados não mostrados).

Para os ensaios em grande escala (500 ml de cultura), uma colônia transformante de cada mutante foi selecionada e pré-inoculada em 30 ml de meio LB líquido suplementado com os antibióticos mencionados. Após 16 h, os pré-inóculos foram depositados em 500 ml de meio LB líquido suplementado e incubados a 37°C por aproximadamente 2 horas até atingir OD₆₀₀, quando a expressão das proteínas foi induzida com 1 mM de IPTG e as culturas foram mantidas a 37°C

sob agitação por mais 4 horas. Em seguida, as células foram submetidas à centrifugação a 7.000 rpm por 10 minutos a 4°C e os precipitados foram ressuspensos em tampão de lise (Tris-HCl PH8,0, 50mM, NaCl 50mM, EDTA 10mM) contendo lisozima (200µg/ml). O DNA das amostras foi quebrado mecanicamente no gelo utilizando-se sonicação (20 x de 30s cada com intervalos de 30 segundos), e os extratos foram centrifugados a 13000 rpm durante 15min a 4°C para a obtenção dos corpúsculos de inclusão. Após a lise e lavagens dos corpúsculos de inclusão, estes foram ressuspensos em tampão glicina 50mM pH 8,0 e as proteínas foram desnaturadas na presença de 7M de uréia (concentração final).

Para a purificação das proteínas insolúveis (Mut.1, Mut.2 e Mut.3, Mut.5 e LaRbp38) as proteínas foram desnaturadas com 7M de uréia e fracionadas em coluna HiTrap Chelating (GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão A (20 mM glicina, 500 mM NaCl, 7 M Uréia), e as proteínas foram eluídas em gradiente constante de tampão B (20 mM glicina pH 8,0, 500 mM NaCl, 7 M Uréia, 0,5 M imidazol) utilizando-se FPLC (ÄKTAprime plus). As frações da coluna que continham as proteínas foram visualizadas em gel 15% SDS-PAGE corado com Coomassie e os eluatos foram agrupados e dialisados “overnight” em tampão glicina 50 mM PH8,0 para garantir que toda uréia, sal e imidazol fossem eliminados da mistura. No dia seguinte, essas amostras estavam precipitadas e foram separadas do sobrenadante por centrifugação à 13.000 rpm/15 min/4 °C. Em seguida os precipitados contendo as proteínas foram resolubilizados em tampão glicina 50 mM PH 8,0 contendo heparina (50µg/µl) e uréia 7M final. A heparina serve como um aditivo do tipo chaperona artificial, para permitir o perfeito renovelamento das proteínas (Lira et al. 2007b). Para a renaturação, as proteínas foram dialisadas sob agitação a 4°C por aproximadamente 7h, com 2 trocas do tampão 50mM glicina PH 8,0 até que não restassem precipitados visíveis na mistura, o que era um indicativo de que a proteína estava renaturada e assim pronta para ser utilizada.

Para a purificação da proteína solúvel (Mut4), o sobrenadante do extrato bacteriano foi fracionado em coluna HiTrap Chelating (GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão C (20 mM tampão fosfato, 500 mM NaCl e 25 mM imidazol) e eluídas com gradiente constante de tampão D (200 mM tampão fosfato, 500 mM NaCl e 0,5 M de imidazol). As frações da coluna que continham

a proteína foram visualizadas em gel 15% SDS-PAGE, corado com Coomassie e os eluatos foram agrupados e dialisados “overnight” em tampão 100 mM de tampão fosfato, EDTA e NaCl para retirada do imidazol.

3.6 Análise estrutural por espectroscopia de Dicroísmo Circular

Para verificar se as proteínas purificadas estavam realmente renaturadas e continham estrutura, essas proteínas foram analisadas por CD (Dicroísmo Circular), uma técnica amplamente utilizada para estimar a quantidade de estrutura secundária através da análise dos sinais característicos nos espectros de proteínas. Para tal 6 μ M de cada proteína foi utilizada para leitura, em um J-810 CD espectropolarímetro (Jasco, Japan), em cubetas de 1mm, no comprimento de onda de 195 nm com intervalos de 0,5 nm, foram feitas 30 acumulações para cada amostra, de forma a minimizar os “ruidos” inespecíficos. Esse experimento foi feito em colaboração com o Prf. Carlos Ramos (LNLS).

3.7. Seqüenciamento dos mutantes de LaRbp38 por espectrometria de massa

As proteínas recombinantes LaRbp38 e seus mutantes foram digeridos com tripsina (“sequencing grade porcine trypsin, Promega”), na proporção 1:20 (tripsina : proteína) e encubada a temperatura ambiente por 3 horas, quando foi adicionado novamente tripsina na proporção 1: 20 ficando agora *overnight* a temperatura ambiente, e então submetidas a análise por espectroscopia de massa. Para determinar as seqüências de alguns peptídeos obtidas por MALDI-TOF MS, utilizou-se o programa MASCOT (www.mas8.lnls.br/mascot) disponível no site do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, Campinas, São Paulo, Brasil. As buscas também foram realizadas manualmente usando-se o banco de dados público do projeto genoma *Leishmania* (*Leishmania* GeneDB, www.ebi.ac.uk/parasites/leish.html).

Todas as análises por espectrometria de massa foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, Campinas, São Paulo, Brasil, em colaboração com o Prof. Fábio Gozzo.

3.8 Análise da expressão de LaRbp38 em *Leishmania* e das proteínas recombinantes por “Western blotting”

Estes ensaios foram realizados utilizando-se extratos totais e de frações subcelulares do parasita, assim como, das proteínas recombinantes, usando-se o kit Amplified Alkaline Phosphatase immun-Blot (Bio-RAD) e soro anti-LaRbp38 na proporção 1:1000 produzido em coelhos em nosso laboratório, a partir de LaRbp38 recombinante (Lira et al., 2007).

3.9. Mapeamento do domínio de ligação a ácidos nucléicos por ensaios de interação proteína-DNA (EMSA)

Ensaio EMSA (Electrophoresis mobility shift assay), foram usados para testar a habilidade dos diferentes mutantes de formar complexos *in vitro* com as seguintes sondas: DNA telomérico simples fita rico em G (Tel1), DNA telomérico dupla fita (LaTel), e DNA de cinetoplasto (kDNA) (Tabela 2), já que LaRbp38 tem afinidade a essas sondas.

60 μ M da proteína LaRbp38 e seus mutantes foram submetidos a um ensaio de interação proteína:DNA, na presença de 1X tampão de reação contendo: 25 mM Hepes PH 7,5, 5,0 mM $MgCl_2$, 0,1 mM EDTA PH 8,0, 10% de glicerol, 100 mM de KCl, 01% NP40 e 0,5 mM DTT e 1pmol do oligonucleotídeo telomérico simples fita (Tel1), marcado radioativamente com 1 μ Ci de 5' [γ - P^{32}] ATP usando T4 polinucleotídeo kinase (T4 PNK, USB, de acordo com o fabricante). As reações foram incubadas por 30 min a 4 °C. Os complexos proteína:DNA foram fracionados em gel não denaturante 6% (acrilamida na proporção 37,5 :1 (acrilamida X bisacrilamida)) em tampão 0,5 X TBE a 4°C, a 130 Volts por 5 horas. Após a corrida, os géis foram expostos a filme de Raio X por 24 horas e revelados (Fernández et al., 2004).

Para os ensaios com DNA telomérico na forma de dupla fita, as proteínas foram submetidas a um gel não denaturante 4% na proporção 19:1 (acrilamida : bis-acrilamida) em tampão 0,5 X TBE. Neste caso, as reações foram realizadas por 30 min a 4 °C em 1 X tampão de reação contendo: 20 mM de Hepes pH 8,0, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,1 M de KCl, 5% glicerol e 0,5 mM DTT, e incubadas

também a 4°C a 130V por 5 horas, ou seja foi usado o mesmo procedimento para o ensaio de simples fita, exceto pelo tampão e pela concentração do gel.

Tabela 2: Seqüência correspondente a cada oligonucleotídeo usados nos ensaios de EMSA e competição

Nome do Oligonucleotídeo	Seqüência do oligonucleotídeo
Tel1 (3 repetiçõesTTAGGG)	5' TTAGGGTTAGGGTTAGGG 3'
LaTel (10 repetições TTAGGG)	5' GGGGAATTCTTAGGGTTAGGG.....GTCGACGGG 3' 5' CCCGTGACCCCTAACCCCTAA.....GAATTCCCC 3'
KDNA	5' TTTCGGCTCGGGCGG TGAAACTGGGGGTTGGTGTA 3'
NonTel *	5' CATATGGAGGCGCCGAAG 3'

* oligonucleotídeos onde não se tem relatadas nenhum tipo de sequencia de mini-circulos ou sequencias do genoma de leishmania.

3.9.1. Obtenção do DNA telomérico na forma de dupla fita (LaTel)

100 pmols dos oligonucleotídeos complementares, na forma de simples fita, *forw Sal* (5' GGGGAATTCTTAGGGTTAGGG.....GTCGACGGG 3') e *rev Sal* (5' CCCGTGACCCCTAACCCCTAA.....GAATTCCCC 3'), foram marcados com 1 µCi de 5'[γ-P³²] ATP, a reação final de 50 µl, contendo 1 µl de oligonucleotídeo (100 pmol), 5 µl de T4 PNK buffer, 2 µl T4 PNK diluída (1:10), 1 µl de 5'[γ-P³²] ATP, foi incubada por 30 min. a 37°C. O excesso de nucleotídeos não incorporados foram retirados em coluna MicroSpin G25 (GE Healthcare), e as 2 reações fita senso e anti senso, foram reunidas e completado o volume para 100 µl com TE 1X e acrescentado 50 mM de NaCl, essa mistura foi fervida por 10 minutos e resfriada a temperatura ambiente.

3.9.2 Ensaio de competição com os mutantes que apresentaram interação aos DNAs testados nos ensaios de EMSA

Para os ensaios de competição foram usadas proteínas não purificadas, devido a grande instabilidade apresentada pelas proteínas após purificação. Para tal LaRbp38 e seus mutantes 1 a 5 foram expressas em bactérias BL21 como descrito no item 3.5. Após a expressão foram realizados os mesmos procedimentos de sonicação e centrifugação e quando necessário solubilização do corpúsculo de inclusão contendo a proteína, em 50 mM de tampão glicina pH 8,0 e 8 M uréia (para concentração final de 7M), seguido da ressolubilização e renaturação para retirada da uréia (item 3.5)

Para garantir que os complexos formados pelas proteínas não purificadas não eram devidos a contaminantes na mistura protéica, ensaios de EMSA foram realizados com extrato de BL21 não transformada e com extrato de BL21 transformada com o vetor pET 28^a+ vazio. Estes testes mostraram que tanto as proteínas purificadas quanto as não purificadas se comportam da mesma maneira, e com ambas obteve-se os mesmos resultados.

Os ensaios de competição foram realizados da mesma forma que os ensaios de EMSA (Item 3.9), com a diferença que foram acrescentados na misturas 50ng de poly(dI.dC) e diferentes competidores em excesso de 50 X mais (50 pmol) do que o DNA marcado utilizado como sonda para cada reação. Os ensaios foram realizados com a proteína LaRbp38, os mutantes 2, 3 e 5 utilizando como DNAs marcados: DNA telomérico simples fita rico em G (Tel1), DNA de cinetoplasto (kDNA) e DNA dupla fita (LaTel) e como competidores “frios” (não marcados) Tel1, LaTel, kDNA e NonTel (Tabela2).

3.9.3. Purificação de oligonucleotídeos usados nos ensaios de EMSA e competição

Para dar início aos procedimentos para purificação dos oligonucleotídeos kDNA e as duas simples fitas(Rev sal e Fow sal) para formação do oligonucleotideo dupla fita, esses oligonucleotídeos foram quantificados em espectrofotometro, onde todos apresentaram concentração em torno de 20ng\ μ l . Os oligonucleotideos foram então submetidos a um gel

denaturante 12% de acrilamida (40%, 19:1) a 150 mA por 30 min em tampão 1X TBE. Após, o gel foi corado com Syber Green (Invitrogen) (1:50 em tampão TBE 1X) e as bandas correspondentes aos DNAs foram visualizadas em transiluminador de luz UV e excisadas. As bandas foram então isoladas do gel, maceradas em água mili Q em tubo ependorf, ficando a 30°C por aproximadamente 48 horas, quando então foram centrifugadas a 3.000g em coluna microspin (Spin X, Costar). Uma alíquota de cada oligonucleotídeo foi submetida a um gel SDS 12% para confirmação da purificação como mostrado na figura 10.

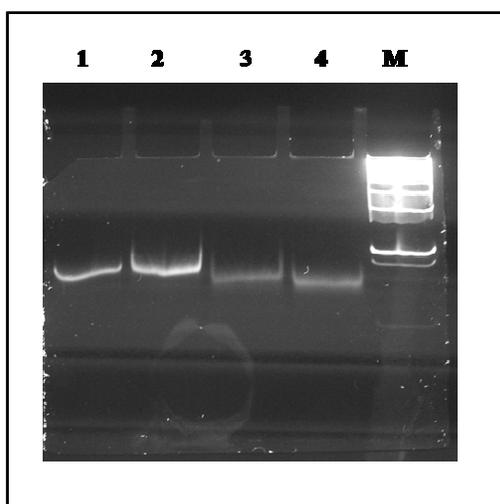


Fig. 10 Gel SDS 12% mostrando o sucesso da purificação dos oligonucleotídeos dupla fita e kDNA. A linhas 1 corresponde ao oligonucleotídeo kDNA purificado, seguido por 2, oligonucleotídeo dupla fita, 3 e 4 que correspondem as simples fitas Rev sal e fow sal que deram origem ao oligonucleotídeo dupla fita, (linha 2) e M marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

3.9.4 Análise quantitativa dos ensaios de interação proteína- DNA

Para verificar o grau de afinidade de LaRbp38 e seus mutantes pelos DNAs testados, os resultados dos ensaios de EMSA e competição, utilizando as diferentes sondas Tel1, LaTel e kDNA, NonTel, foram submetidos á análise quantitativa da intensidade de formação e inibição dos complexos usando-se o programa Scion Image, de acordo com Fernadez et al. (2004) . Os resultados foram submetidos a seguinte formula para obtenção das porcentagens de atividade de ligação.:

$$\% \text{ competição/ligação} = 100 \times (1 - (C_c/C)),$$

onde C_c representa o valor da intensidade do complexo formado na presença de competidor; C , valor da intensidade do complexo formado na ausência de competido

3.10. Obtenção dos extratos totais, de núcleo e de mitocôndria para realização de *Western blotting*

Os extratos totais e das frações subcelulares foram obtidos a partir de cultura em fase exponencial, de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* na concentração de 1×10^8 células.

As células foram lavadas com 1X PBS e rompidas utilizando-se Tampão RIPA (150 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS) em volume de 200 μ l de tampão RIPA + 10U de DNase (GE Healthcare) + 1 μ l "cocktail" de inibidores de proteases (Calbiochem). O extrato parasitário foi incubado no gelo por 15 min e em seguida misturado fortemente com auxílio de vortex durante 10 segundos. Este procedimento foi repetido 5 vezes. Por fim, o extrato foi centrifugado a 10.000 rpm durante 8 min. O sobrenadante contendo extrato protéico parasitário total foi recuperado e estocado no freezer a -20°C .

Os extratos de núcleo e mitocôndria foram obtidos através do Kit Mitochondrial Fractionation (Active Motif), de acordo com especificações do fabricante .

3.11 Obtenção do soro policlonal anti-LaRbp38

Porções de um gel SDS-PAGE contendo a banda correspondentes a proteína recombinantes LaRbp38 (700 μ g) foi excisada e homogenizada na presença de PBS 1X (PBS, 0.15 M NaCl e 10mM fosfato de sódio, pH7.2) e emulsificado com adjuvante completo de Freund (vol/vol). A suspensão foi injetadas subcutaneamente em coelhos fêmeas Nova Zelândia. A injeção subcutânea foi repetidas com (800 μ g) das proteínas emulsificadas em 2 X Adjuvante Incompleto de Freund 1:1 (v:v). Os coelhos sofreram uma última injeção contendo 900 μ g da proteína por via intravenosa 42 dias após o início da imunização, e o soro foi coletado no dia 50 por punção cardíaca. O anticorpo anti-LaRbp38 presente no soro do coelho foi testados em ensaio de Western blotting.

3.12. Ensaios de imunoprecipitação

A imunoprecipitação foi realizada com o Kit Seize X Protein A immunoprecipitation –Pearce, seguindo especificações do fabricante. Para tal foram usados 3,5µg do anticorpo anti LaRbp38 e 3,5 µg de extrato de núcleo. Os resultados foram confirmados por Western blotting através do Kit - Amplified Alkaline Phosphatase immun-Blot (Bio-RAD), usando- se soro anti-LaRbp38, anti-LaRPA e anti-TRF.

3.13. Confirmação da sub-localização celular de LaRbp38 por imunofluorescência indireta

Para os ensaios de imunofluorescência, as lâminas foram previamente lavadas e tratadas com 0,1% de polilisina (Poly-L-lysine hydrobromide- Sigma). 1.10^6 parasitas em fase promastigota (*L.amazonensis*) foram centrifugados a 5000 rpm, durante 2 min., descartado o sobrenadante, o “pellet” foi ressuspenso em 1ml de PBS 1 X gelado e novamente centrifugado. Logo após os parasitas foram fixados em 400µl de fomalina 1% e depositados na lâmina tratada com polilisina, permanecendo ai por 5 minutos. Em seguida foram lavados 2 vezes com PBS 1X. Os parasitas foram permeabilizados durante 5 min. a temperatura ambiente na presença de 10µl de 0,1% Triton X-100 (Calbiochem) e em seguida lavados com PBS 1 X. Logo após, os parasitas foram incubados com o soro anti-LaRbp38 na diluição 1:500, por 2 horas na geladeira. O soro foi previamente diluído em uma solução de PBS com 4% de BSA. Após a incubação a lâmina foi lavada cuidadosamente com PBS 1X e os parasitas foram então incubados por 2 horas na geladeira e na ausência de luz, com o anticorpo secundário anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488 na diluição 1:300 na presença de 1X PBS+ 4% BSA. Em seguida as lâminas foram lavadas com PBS 1X, secas a temperatura ambiente e fechadas com 3 µl de Vectashield+DAPI (Vector) e lacradas com lamínula e esmalte. As imagens foram analisada por microscopia de fluorescência (Nikon Exclipse 80i), usando aumento de 100X e analisadas através do programa Nis-Elements BR.

4. Resultados

4.1. Construção e clonagem dos mutantes de LaRbp38

A partir da seqüência predita de aminoácidos do gene que codifica *LaRbp38* (1047 pb), obtida no banco de dados publico (nº. acesso no GenBank: AY485300), foram desenhados 5 mutantes de forma que cada um fosse um a sobreposição do outro. Os mutantes foram nomeados: Mut1, Mut2, Mut3, Mut4. e Mut5, conforme mostrado na Fig.11.

O mutante 1 (mut1) compreende a porção N-terminal da proteína apresentando 423 pb, mut2 (423 pb) representa juntamente com mut3 (327pb) a porção mediana da proteína, o mut4 contém a porção C-terminal de *LaRbp38* e tem aproximadamente 339pb e o mut5 (705pb), contém toda a porção N-terminal mais parte da porção mediana da proteína.

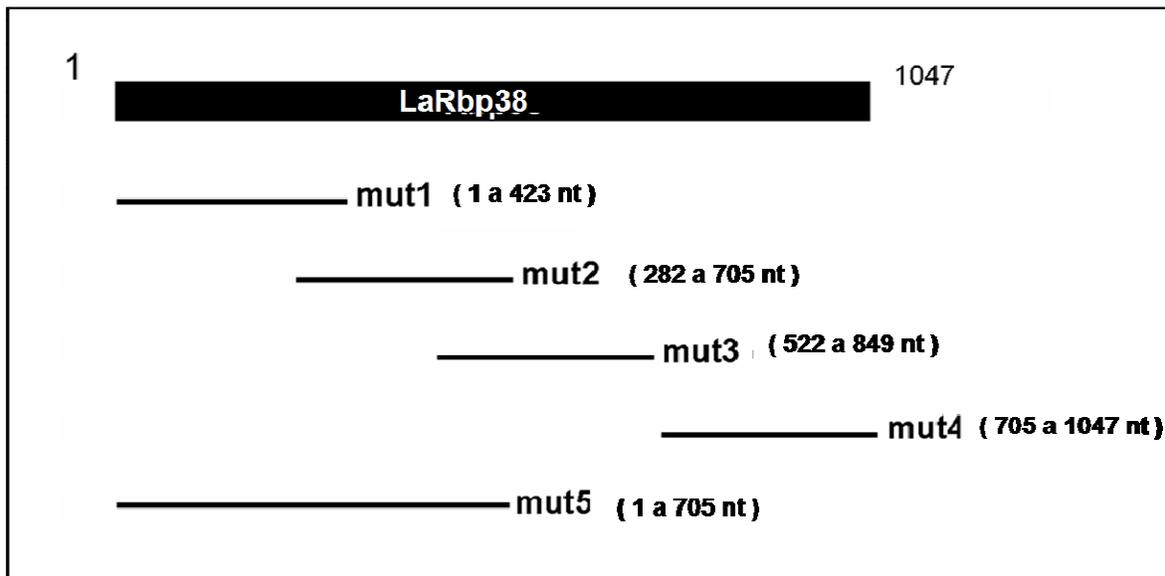


Fig. 11 Diagrama mostrando a posição dos mutantes (mut1-mut5) em relação ao gene que codifica a proteína *LaRbp38*. Os números 1 a 1047, indicam a posição do primeiro e último nucleotídeos (nt) no gene *LaRbp38*, nucleotídeos 1 a 423 no mut1, nucleotídeos 282 a 705 no mut2, nucleotídeos 522 a 849 no mut3, nucleotídeos 705 a 1047 no mut4 e nucleotídeos 1 a 705 no mut5.

Os 5 mutantes foram obtidos através da amplificação de DNA plasmidial (*LaRbp38* clonado no vetor pCR® 2.1 – TOPO) por PCR usando conjuntos de iniciadores específicos (Tabela1). Cada um dos produtos de PCR obtidos, foram clonados em vetor pCR® 2.1 – TOPO, e o sucesso das clonagens foi confirmado por PCR de colônias transformantes e por seqüenciamento automático (Figs. 12 A-C e dados não mostrados).

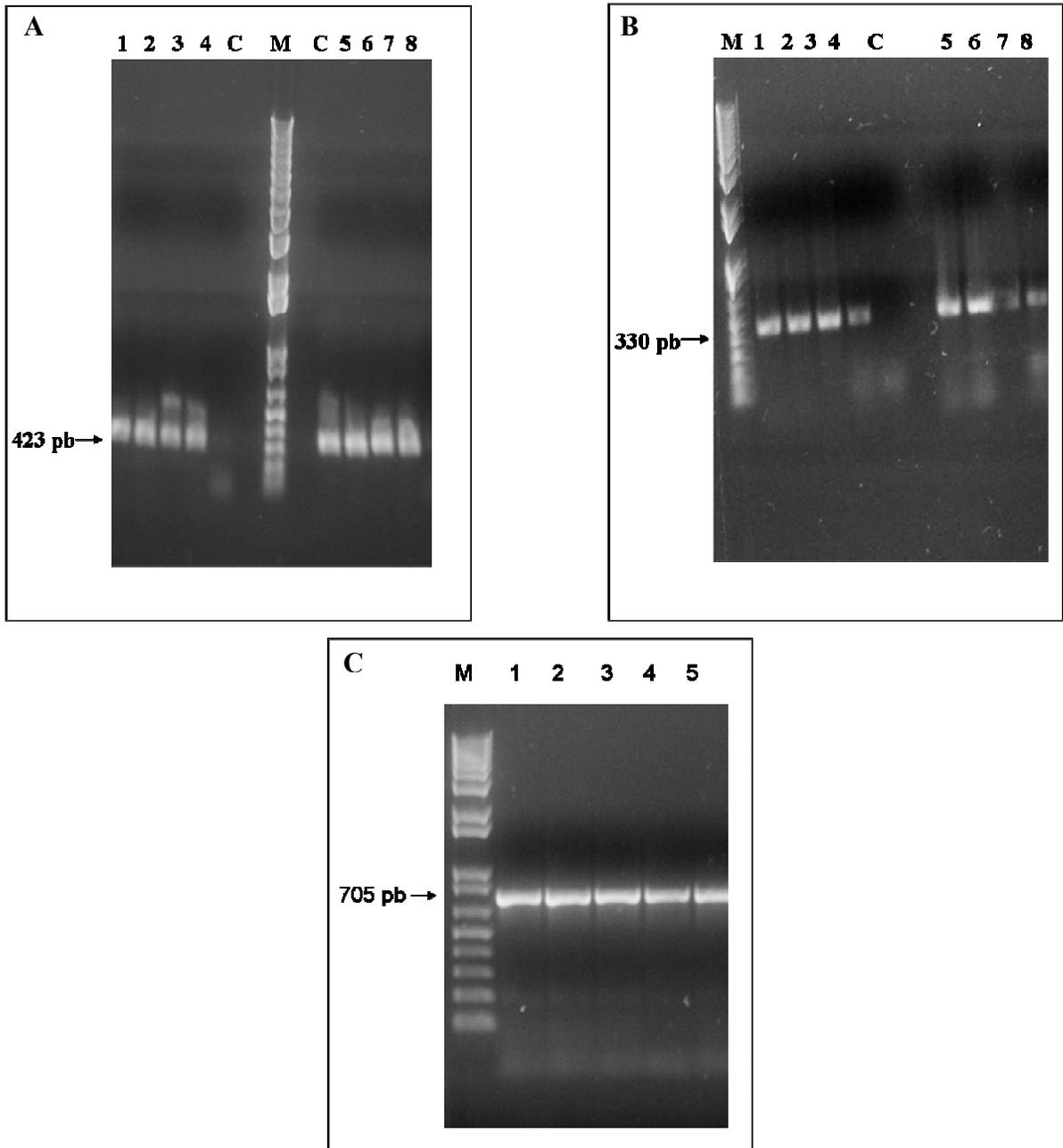


Fig. 12 PCR de colônia mostrando o sucesso da clonagem dos mutantes 1-5 no vetor TOPO. Em A) as linhas seguem-se respectivamente por 1 a 4 que representam colônias geradas da clonagem do mut1 (423 pb), seguindo-se ao marcador molecular (M)1 kb plus DNA Ladder, 5-8 indicam as diferentes colônias submetidas a PCR geradas da clonagem do mut2 (423 pb) e C representa o controle negativo da reação (amplificação na ausência de DNA). Em B) As linhas de 1 a 4 representam as diferentes colônias usadas nas reações de PCR geradas da clonagem do mut3 (327 pb), as linhas 5-8, indicam as diferentes colônias utilizadas para PCR geradas da clonagem do mut4 (339 pb) e C representa o controle negativo da reação. Em C) as linhas de 1 a 5 representam as diferentes colônias geradas da clonagem do mut5 (705 pb).

Em seguida, uma colônia de cada clone foi multiplicada em cultura e utilizada para produção de DNA plasmidial, os quais foram purificados e seqüenciados. Uma vez confirmadas cada uma das clonagens procedeu-se com a subclonagem desses DNAs no vetor de expressão pET 28 (a+). Os insertos e o vetor pET, foram digeridos com as enzimas de restrição específicas *NdeI* e *XhoI*, de forma a permitir a clonagem direcionada no vetor e que as proteínas resultantes fossem expressas com um “tag” de 6xHis no N-terminal (ver Material e Métodos para detalhes). Também neste caso, o sucesso da clonagem de cada mutante foi confirmado por PCR a partir de DNA plasmidial purificado e posterior seqüenciamento de nucleotídeos (Tabela 3). Os produtos de amplificação foram fracionados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo conforme mostrado nas Figs.13 A e B, indicando o sucesso da clonagem.

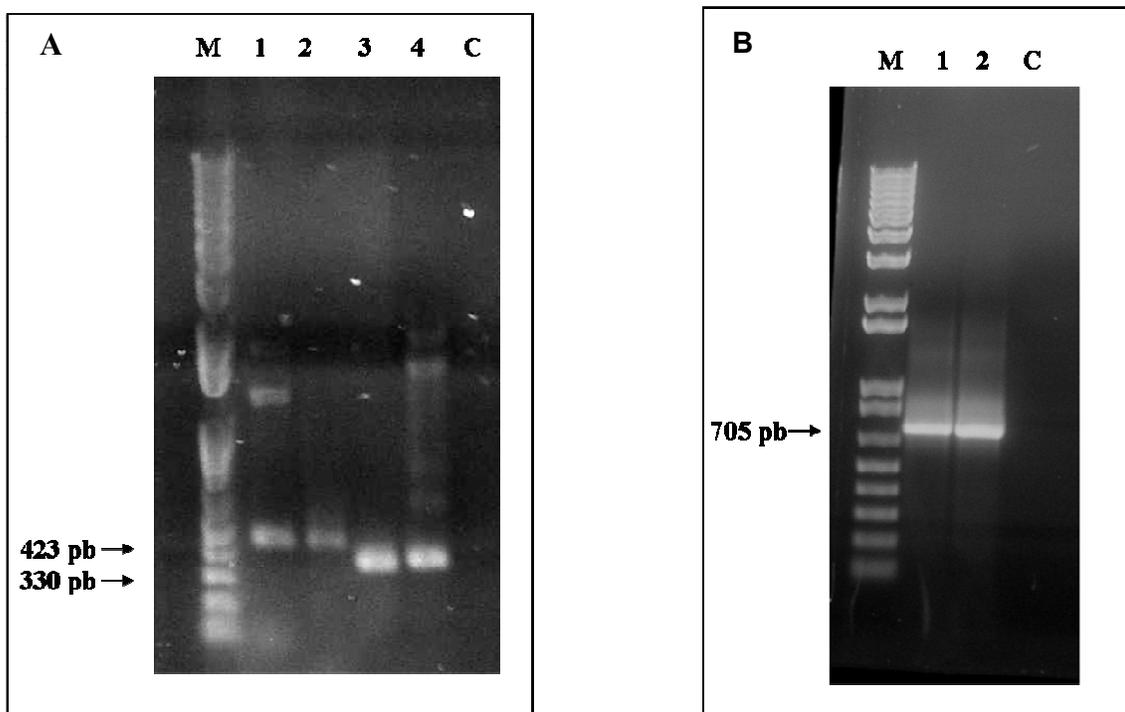


Fig. 13 Amplificação por PCR dos insertos referentes aos mutantes (1-5) clonados no vetor pET 28 (a+). Em A e B estão géis de agarose 0,8% corados com brometo de etídeo. Em A clonagem dos mutantes 1-4, respectivamente: M, marcador de peso molecular 1kB plus DNA Ladder, linhas 1 e 2, mut1 e mut 2 (423 pb), linha 3, mut3 (327pb) e linha 4, mut4 (339pb),. Em B, marcador molecular, linhas 1 e 2, que corresponde ao mut 5 com 705 pb.

Tabela 3. Resultado do seqüenciamento automático de nucleotídeos dos mutantes deletoriais de *LaRbp38*. Na seqüência de nucleotídeos do gene *LaRbp38* estão assinalados em colorido as posições das seqüências dos iniciadores usados para amplificar por PCR cada um dos 5 mutantes. Nas seqüências de nucleotídeos dos 5 mutantes (mut 1, 2, 3, 4, 5) estão marcados em colorido os iniciadores senso e anti-senso correspondentes, conforme listado na Tabela 1.

LaRbp38
<p>ATG CTCCGTCGCGTG TCTTTGTCTGCGCTGTTGCAGCGCGTGGCTACTGGTGCCGTAATCGCCACTGCTGGTTCGCACCATCGTTGTC TTCAGTCAGCAGCATCACATCCTGGAGAGCAACCAGCGGGCGCGCAACAGCCCCAGTAATGTGTGGATCGAGGACTGGGAGGCGG ACCGCCTAGGCATGAAGCCGGAGCCAGGTGCCCTGCCTACGCAGCTGGTTTTGGATAAGCAGCTTGAGTTGTTCAACTTCGATCAG CTCTCTCGCTCCGGAGGTGATG GAGGCGCCGAAG CACAGCAGTTACAGCAGCCGCAAGGTCTACGGTGAGCGGCTGCAGTTCCG AGCTCAATGACCGTGCGCAGCGGCACAGTTACCAAAGCAAGTGGTGGATCACACGTGGACAGGCGTATAAG GAGAATCTGCAG TTT AAAGCCAACGCGCGGTGCGAGCATTCTCTGACCAAATCGCAGATTAAGCTCTTCACTCCAGCCAGCTCAGCGGCGGGCAAGCCCT CCAGCAG TACCCCGT AGCGGTGGCAGTGCCTGCGTGTACAGCAAGAAGGGGGAGGCCCTTCCAGCTTTTGCAGGACCACATCAAGT CGAACGACTTCAACAGCGGCTGTACTTCACCCGCCGTCAAATGGAGTTCTTCAAGCTCGCCCCGTTGCCGGACCAGTTGCCAGTG CTCCAG GAGGCGACAACG GGCGACCGTCAC CTATCTACAACGTGGACCAGCTGGAGGACCCGCACCTGGCGCTGAAGACGCTGCA GCGTGCGCCGGTGAATGTGCCGACCTTCTGTTATCTGGAGAGCCGATCATGTCCGAAAACACC AGGAAGTTCCCG AAGACGTTCC GCAGCAACTACTGCTGACCCGCGGTGATGCCGAGCTTTACAGTGGCCATCAAGGAGAGTGAAAAGCGCCGCGGTGTGCCGT CAGCACTGGACTTCTGCCCGGTCCAGTACGAGCTGTTCAACGTGGAGCAGCTGTGCGAACCTGATGAGGCGTTTCGCACGCGCG GGTCTG CTCATTAG TAG</p>
Mut1
<p>ATG CTCCGTCGCGTG TCTTTGTCTGCGCTGTTGCAGTGCCTGGCTGCTGGTGCCGTAATCGCCACTGCTGGTTCGCACCATCGTTGTC CTTAGTCAGCAGCACCATCTGGAGAGCAACCAGCGGGCGCGCAACAGTCCAGCAATGTGTGGATCGAGGACTGGGAGGCG GACCGCTTAGGCATGAAGCCGGAGCCAGGTGCCCTGCCACGCAGCTGGTTTTGGATAAGAGCTGGACCTTTCACTTTATCAGTTC TCTCCCTCGCCCCGAGGTGATGGAGGAGTACCAAGATTTTTAATGCGGGTAATCAAATTAATGAAAGCTGCGTTTTAATAATAA CCGCGCATCTACAGCTATCAAGCAGTGGTGAATACTGTGAACAGGCGTACAAG GAG AATCTGCAG TAG</p>
Mut2
<p>ATG GAGGCGCCGAAG CACAGCAGTTACAGCAGCCGCAAGGTCTACGGTGAGCGACTGCAGTTCGAGCTCAATGACCCGCGCGCAGC GGCACAGCTACCAAAGCAAGTGGTGGATCACACGTGGACAGGCGTACAAGGAGAATCTGCAGTTTAAAGCCAACGCGCGGTGAGC ATCCTCTGACCAAATCGCAGATCAAGCTCTTTCACTCCAGCCAGCTCAGCGGCGGCAAGCCCTCCAGCAGTCCCGGTTAGCGGT GGCAGTCGCCGCGTGTACAGCAAGAAGGGGGAGGCCCTTCCAGCTTCTGCAGGATCACATCAAGTCAACGACTTCAACAGCGGTCT GTACTTCACCCGCCGTCAAATGGAGTTCTTCAAGCTCGCCCCGTTGCCGGATCAGGTGCCAGTGGTCCAG GAGGCGACAACG TAG</p>
Mut3
<p>ATGCAG TACCCCGT AGCGGTGGCAGTGCCTGCGTGTACAGCAAGAAGGGGGAGGCCCTTCCAGCTTCTGCAGGATCACATCAAGTC GAACGACTTCAACAGCGGTCTGTACTTCACCCGCCGTCAAATGGAGTTCTTCAAGCTCGCCCCGTTGCCGGATCAGGTGCCAGTGG TCCAGGAGGCGGCAACGCGGCGACCGTACCTTATCTACAACGTGGACCAGCTGGAGGACCCGCACCTGGCGCTGAAGACACTGCA GCGTGCGCCGGTGAATGTGCCGACCTTTCTGCTATCTGGGAGCCGATCATGTCCGAAAACACC AGGAAGTTCCCG TAG</p>
Mut4
<p>ATG GGCGACCGTCAC CTATCTACAACGTGGACCAGCTGGAGGACCCGCACCTGGCGCTGAAGACGCTGCAGCGTGCGCCGGTGA ATGTGCCGACCTTCTGTTATCTGGAGAGCCGATCATGTCCGAAAACACCAGGAAGTTCCCGAAGACGTTCCGCAGCAACTACTGGC TGACCCGGCGGTGATGCCGAGCTTTACAGTGGCCATCAAGGAGAGTGAAAAGCGCCGCGGTGTGCCGTTTCAGCACTGGGACTTC GTCCCGGTCCAGTACGAGCTGTTCAACGTGGAGCAGCTGTGCGAACCTGATGAGGCGTTTCGCACGCGCGGGTCTG CTCATTAG AG</p>
Mut5
<p>ATG CTCCGTCGCGTG TCTTTGTCTGCGCTGTTGCAGCGCGTGGCTACTGGTGCCGTAATCGCCACTGCTGGTTCGCACCATCGTTGTC TTCAGTCAGCAGCATCACATCCTGGAGAGCAACCAGCGGGCGCGCAACAGCCCCAGTAATGTGTGGATCGAGGACTGGGAGGCGG ACCGCCTAGGCATGAAGCCGGAGCCAGGTGCCCTGCCTACGCAGCTGGTTTTGGATAAGCAGCTTGAGTTGTTCAACTTCGATCAG CTCTCTCGCTCCGGAGGTGATG GAGGCGCCGAAG CACAGCAGTTACAGCAGCCGCAAGGTCTACGGTGAGCGGCTGCAGTTCCG AGCTCAATGACCGTGCGCAGCGGCACAGTTACCAAAGCAAGTGGTGGATCACACGTGGACAGGCGTATAAG GAGAATCTGCAG TTT AAAGCCAACGCGCGGTGCGAGCATTCTCTGACCAAATCGCAGATTAAGCTCTTCACTCCAGCCAGCTCAGCGGCGGGCAAGCCCT CCAGCAG TACCCCGT AGCGGTGGCAGTGCCTGCGTGTACAGCAAGAAGGGGGAGGCCCTTCCAGCTTTTGCAGGACCACATCAAGT CGAACGACTTCAACAGCGGCTGTACTTCACCCGCCGTCAAATGGAGTTCTTCAAGCTCGCCCCGTTGCCGGACCAGTTGCCAGTG CTCCAG GAGGCGACAACG</p>

4.2. Expressão e purificação dos mutantes e da LaRbp38 em sistema bacteriano

Testes preliminares de indução/expressão foram realizados para cada uma das proteínas recombinantes. Estes ensaios foram realizados para verificar quais as condições ideais de expressão de cada uma das proteínas (dados não mostrados). Para tal foram obtidos extratos totais de 500 ml de cultura de bactérias *E.coli* BL21 DE3 códon plus transformadas com cada um dos plasmídeos (ver Tabela1). Todas as proteínas recombinantes apresentaram tempo de expressão por volta de 4 horas após a indução com 1 mM de IPTG.

Para verificar a solubilidade das proteínas, tanto as frações insolúveis (corpúsculos de inclusão) quanto as frações solúveis (sobrenadantes dos extratos) foram submetidas a fracionamento em gel SDS-PAGE 15%, corado com Coomassie Blue. De acordo com os resultados mostrados nas Figs. 14 A e B, pudemos observar que as proteínas recombinantes expressas pelos mutantes mu1 (linhas 3 e 4), mut2 (linhas 5 e 6) mut3 (linhas 7 e 8) e mut5 (linhas 11 e 12) bem como a proteína LaRbp38 (linhas 1 e 2), encontram-se na fração insolúvel de cada extrato (Fig.14 A, linhas 2, 4, 6, 8, e Fig.14B, linha 12). Apenas a proteína expressa pelo mut4 (linhas 9 e 10) apresenta-se na forma solúvel, ou seja, no sobrenadante do extrato (Fig.14 B, linha 9).

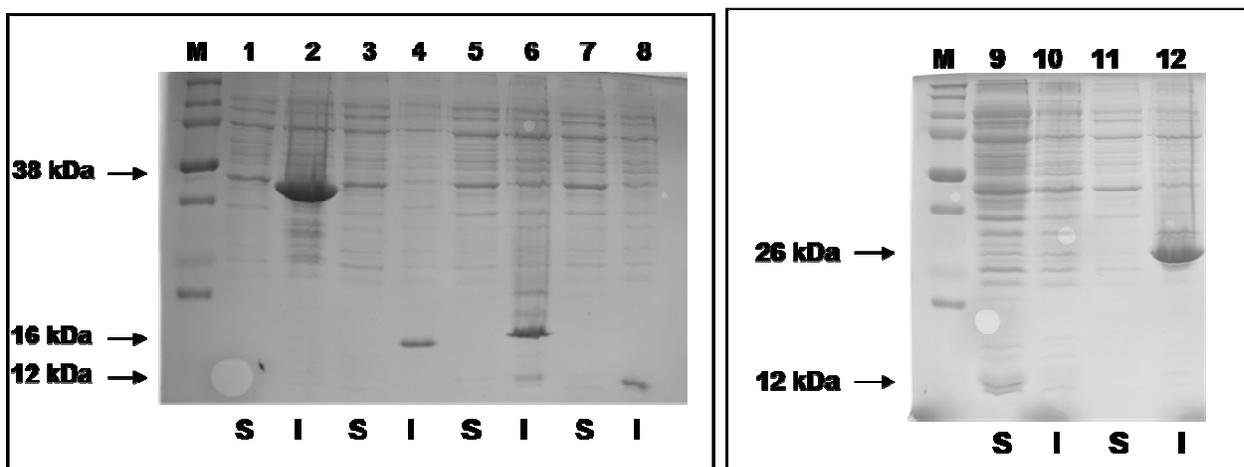


Fig.14 Expressão das proteínas recombinantes mutantes e de LaRbp38 em sistema bacteriano. Em A) e B). Gel SDS-PAGE 15% corados com Comassie blue. (M) Marcador molecular (Dual Color). Nas linhas 1 e 2 as frações solúveis e insolúveis de LaRbp38, respectivamente, linhas 3 e 4, as frações solúveis e insolúveis do mut1, linhas 5 e 6, as frações solúveis e insolúveis do mut2, linhas 7 e 8, as frações solúveis e insolúveis do mut3, linhas 9 e 10, as frações solúveis e insolúveis do mut4 e linhas 11 e 12, as frações solúveis e insolúveis do mut5. S e I correspondem as frações soluveis e insolúveis de cada mutante respectivamente.

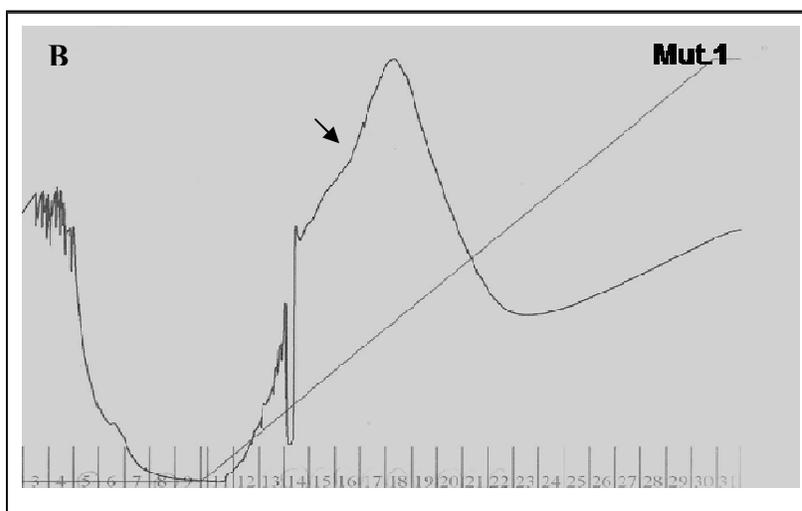
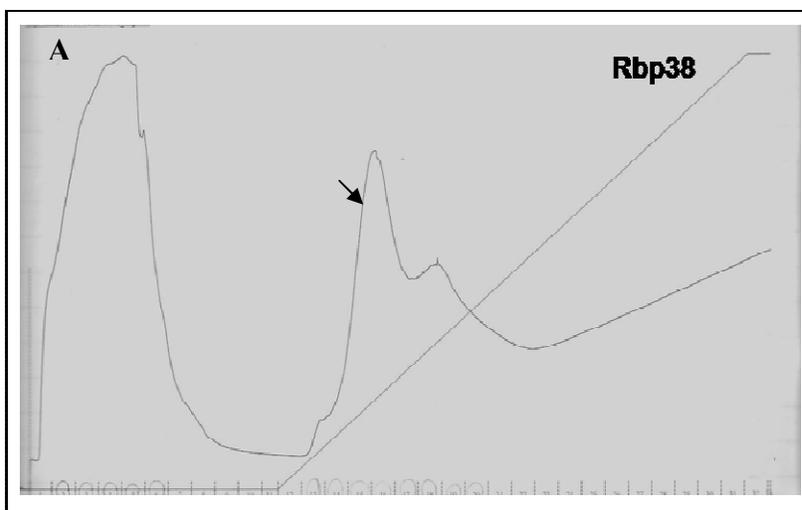
Verificada a solubilidade de cada mutante, estes foram purificados separadamente e de acordo com sua solubilidade, em coluna de afinidade Hi-trap Chelating em HPLC (ÄKTA prime plus) segundo descrito em Materiais e Métodos (item 3.5). As frações eluídas das colunas (Fig. 15 A-F) foram submetidas a um gel SDS-PAGE 15% e reunidas. Em seguida as proteínas presentes em corpúsculos de inclusão e que foram purificadas em condições denaturantes (na presença de 7M uréia) LaRbp38, mut1, mut 2, mut 3 e mut5, foram renaturadas de acordo com protocolo descrito em Materiais e Métodos (item 3.5) e a proteína expressa na fração solúvel do extrato o mut4, foi dialisada para retirada do imidazol (Material e Métodos). O gel SDS-PAGE mostrado na Fig. 16 comprova que todas as proteínas recombinantes foram purificas com sucesso.

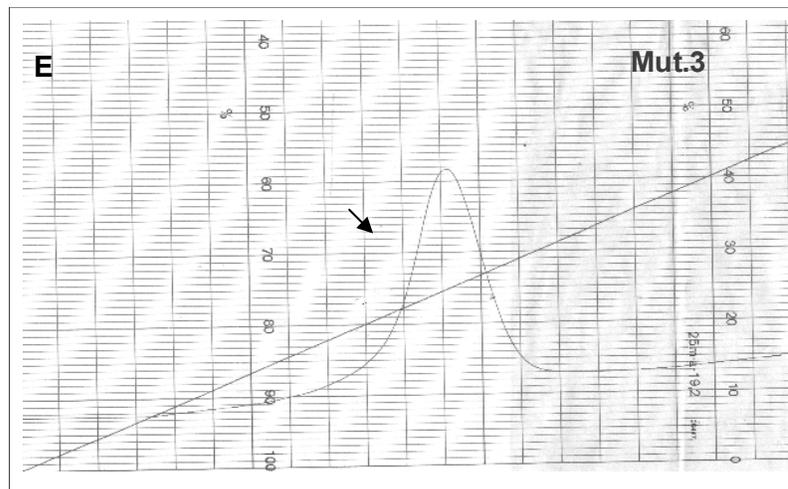
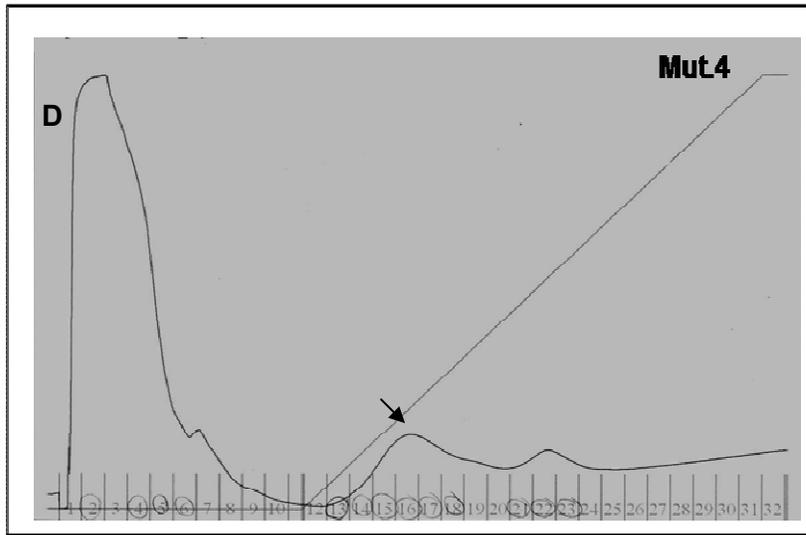
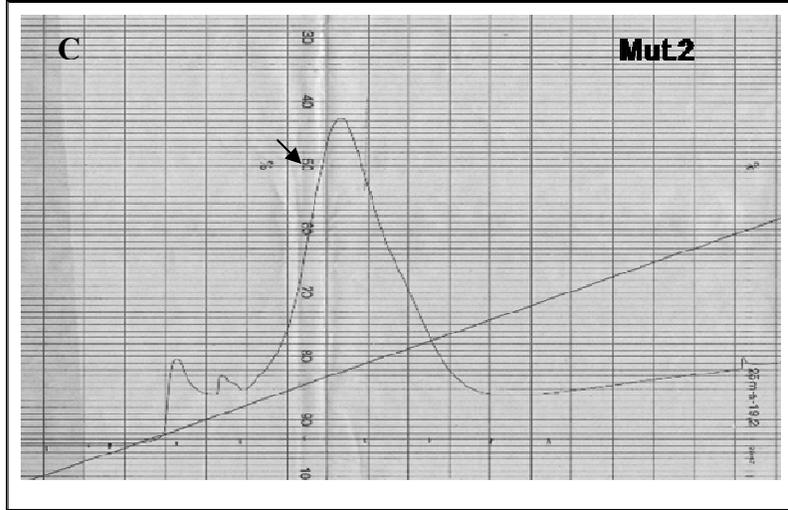
Tabela 4. Características de cada proteína recombinante, tais como, tamanho aproximado em kDa, região onde se localizam os mutantes na proteína LaRbp38 inteira e o ponto isoelétrico.

Proteína	Tamanho estimado da proteína ^a	Região	P.I. ^b
LaRbp38	38 kDa	Total	9,4
mut1	16 kDa	N-terminal	9,4
mut2	16 kDa	Mediana	9,9
mut3	12 kDa	Mediana	8,2
mut4	12 kDa	C-terminal	6,1
mut5	26 kDa	N-terminal	9,7

^a para todas as proteínas mutantes o peso molecular estimado não inclui o 6xHis-N-terminal

^b P.I. Ponto isoelétrico (as características de ponto isoelétrico nos forneceram parâmetros no que diz respeito a solubilidade de LaRbp38 e de cada mutante construído.





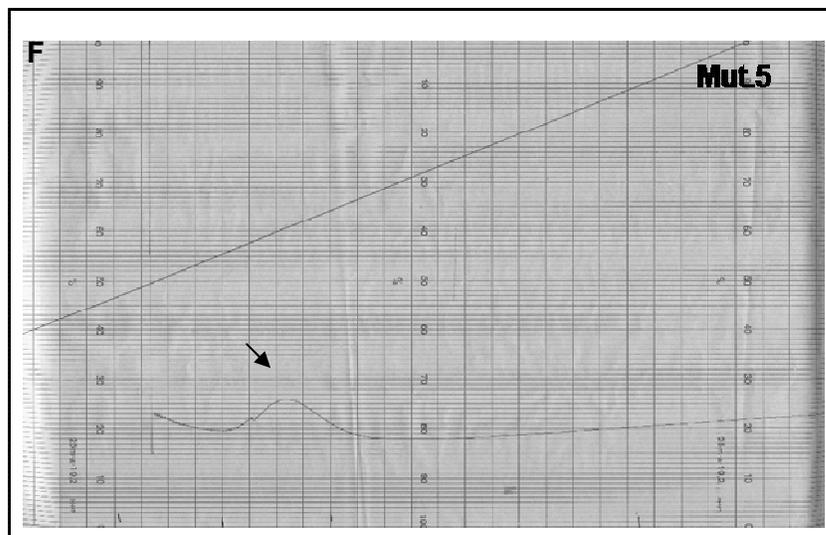


Fig. 15 Cromatogramas referentes a purificação das proteínas, mostrando o momento da eluição de cada proteína recombinante durante purificação em coluna de afinidade HiTrap Chelating. A figura contém respectivamente os picos da eluição de LaRbp38, mut1, mut2, mut3, mut4 e mut5 (indicadas pelas letras A-F). As setas indicam o momento da eluição de cada proteína.

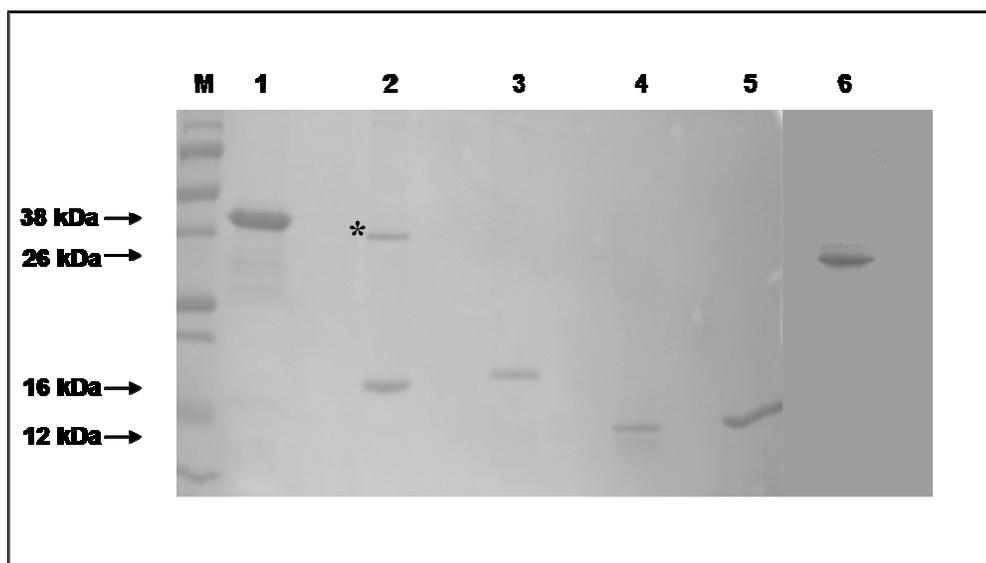


Fig. 16 Proteínas recombinantes purificadas em coluna HiTrap Chelating. Gel SDS 15% corado com Coomassie blue, contendo a proteína LaRbp38 inteira (linha 1) e as 5 proteínas mutantes (linhas 2-6) purificadas em coluna de afinidade HiTrap Chelating em HPLC (ÅKTAprime plus). A ausência de contaminantes visíveis indica o nível de pureza obtido durante a purificação das proteínas. M, (marcador de peso molecular Dual Collor) LaRbp38 (38kDa), mut1 e mut2 (16 kDa), mut3 e mut4 (12 kDa) e mut5 (26 kDa). O asterisco aponta uma banda proteica purificada juntamente com o mut1, que pode ser um contaminante não excluído durante a purificação (ver Fig 16, linha 2).

Para verificar se os mutantes construídos eram reconhecidos pelo soro anti-LaRbp38, foram realizados ensaios de *Western blotting* com as proteínas purificadas em coluna de afinidade, revelados com soro primário anti-LaRbp38. Todos os mutantes e a proteína inteira foram reconhecidos pelo soro (Fig.17 linhas 1 a 6), confirmando o sucesso da expressão dos mesmos.

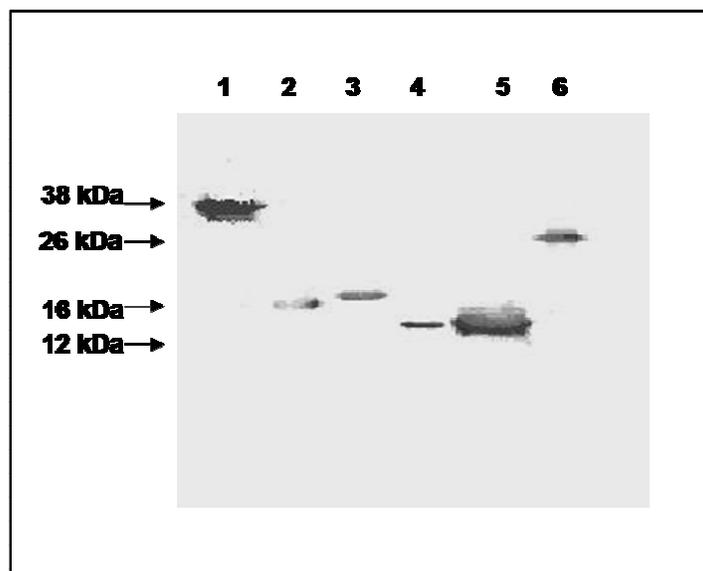


Fig. 17 Ensaio de Western blotting confirmando a expressão dos mutantes de LaRbp38. Aproximadamente 5 μ g de LaRbp38 (linha 1) e de cada um dos 5 mutantes (linhas 2 a 6) foram primeiramente submetidos a fracionamento em gel 15% SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose. O *Western blotting* foi revelado com o soro anti-LaRbp38 na diluição 1:1000. M, marcador molecular Precision Standards- Dual color – BIORAD.

4.3. Análise da estrutura secundária das proteínas recombinantes por espectroscopia de Dicroísmo Circular

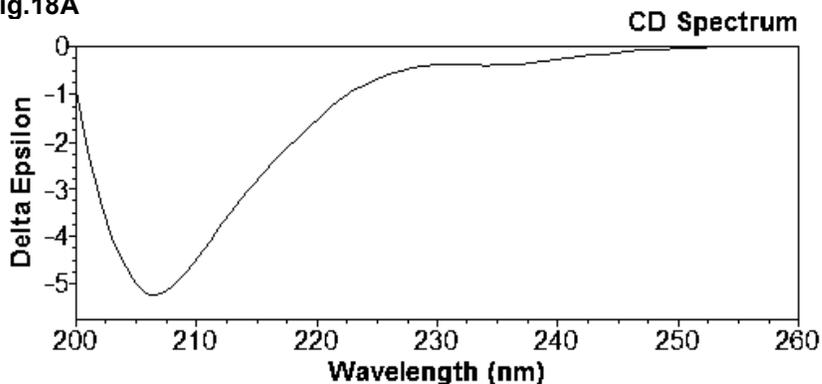
Para verificar se as proteínas purificadas (LaRbp38 e seus 5 mutantes) apresentavam estrutura secundária, elas foram submetidas a análise por espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD, circular dichroism), utilizando-se um espectropolarímetro Jasco J-810 com temperatura controlada pelo sistema Peltier PFD 425S. Os experimentos aqui mostrados foram feitos em colaboração com o grupo do Prf. Carlos Ramos do IQ- UNICAMP. A técnica de CD é amplamente utilizada para estimar a quantidade de estrutura secundária de proteínas através da análise dos sinais característicos nos espectros. A avaliação da estabilidade de uma proteína por CD pode oferecer informações sobre a

presença de domínios com diferentes estabilidades e sobre processos dinâmicos como interações com ligantes (Lucca. *et al*, 2007).

Os espectros mostrados na Fig. 18, foram obtidos com 0,5mg/ml de cada proteína em tampão glicina 50 mM pH 8,0. Como resultados conseguimos prever a estrutura das proteínas LaRbp38 inteira e dos 5 mutantes usando o programa CDNN (Figs. 18 A a F), embora os mutantes mut2, mut3 e mut5 tenham apresentado baixo sinal de leitura de CD quando comparado com as demais proteínas analisadas. Isto pode ter ocorrido devido a baixa concentração de proteínas enoveladas versus desenoveladas na mistura durante o momento da leitura em espectrofotômetro, resultando em uma estimativa incorreta da quantidade de proteínas verdadeiramente enoveladas na mistura. Por outro lado, como estes experimentos foram repetidos diversas vezes e os resultados foram repetitivos, esses espectros podem corresponder exatamente a estruturas próprias de cada mutante, os quais podem ter perdido parte(s) essencial(is) da proteína tornando impossível o reenovelamento adequado dos mesmos e como conseqüência seu baixo sinal de leitura de CD. Essa diferença nos espectros de CD dos diferentes mutantes, pode estar relacionada a presença das regiões N e C terminal da proteína que podem conter individualmente resíduos de aminoácidos essenciais para manter a estrutura dessas proteínas.

Em relação a estrutura das proteínas analisadas, pudemos notar espectros característicos indicando que nas estruturas secundárias dessas proteínas encontram-se α hélices e folha β , o que é condizente com experimentos anteriores realizados por Lira et al. (2007c) para a proteína LaRbp38 recombinante. A proporção de α hélice para LaRbp38 inteira e para o mut4 é superior a folha β , enquanto que para os mutantes mut1, mut2, mut3 e mut5 predominam estruturas do tipo folha β . Na figura abaixo (Figs.18 A-F) as porcentagens de estruturas paralelas e antiparalelas, correspondem a diferentes tipos de folha β . Esse experimento foi de grande valor, pois poderá auxiliar na tentativa de se determinar a presença de domínios estruturais de LaRbp38, e para o planejamento futuro de ensaios cristalográficos de LaRbp38 e seus mutantes.

Fig.18A

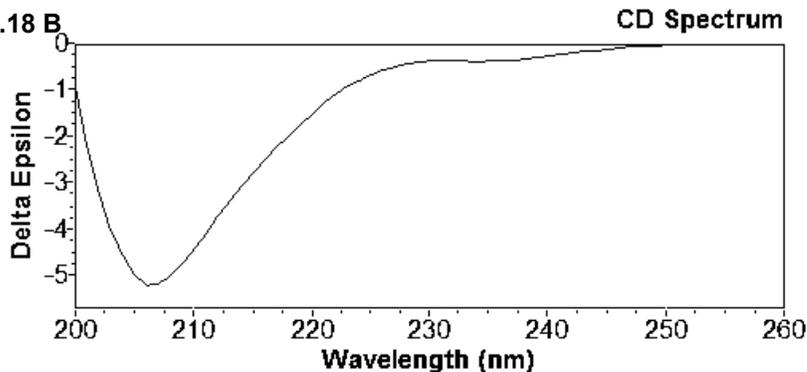


LaRbp38

210-260 nm

Helix	41,3 %
Antiparallel	6,4 %
Parallel	7,1 %
Beta-Turn	15,5 %
Rndm. Coil	28,2 %
Total Sum	98,5 %

Fig.18 B

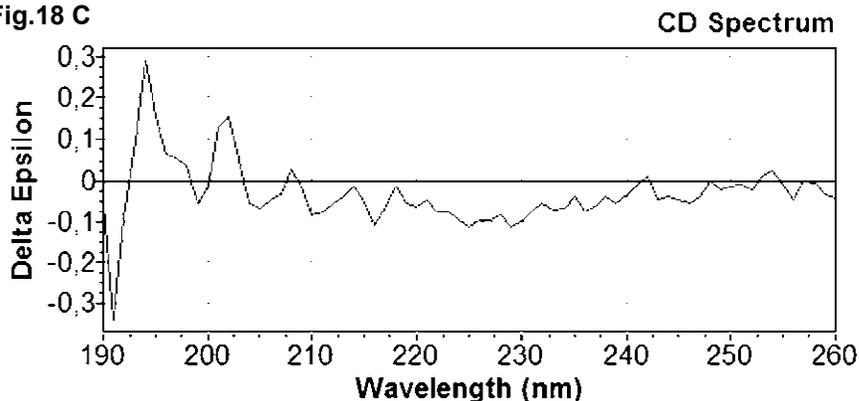


Mut.1

205-260 nm

Helix	32,8 %
Antiparallel	8,3 %
Parallel	9,2 %
Beta-Tur	17,2 %
Rndm. Coi	32,9 %
Total Sum	100,3 %

Fig.18 C

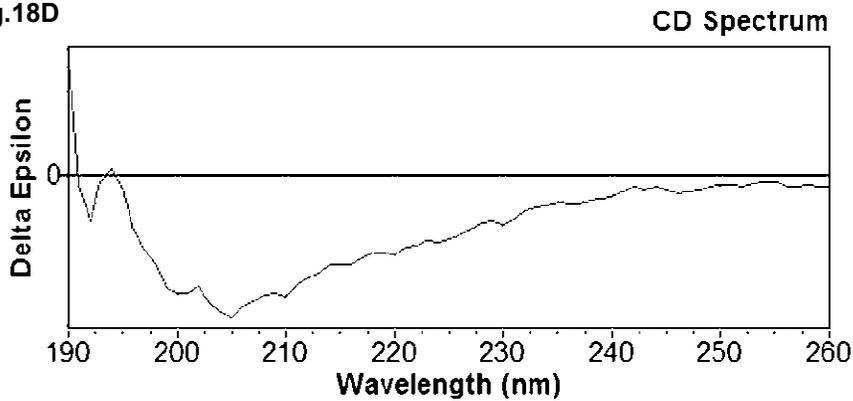


Mut.2

205-260 nm

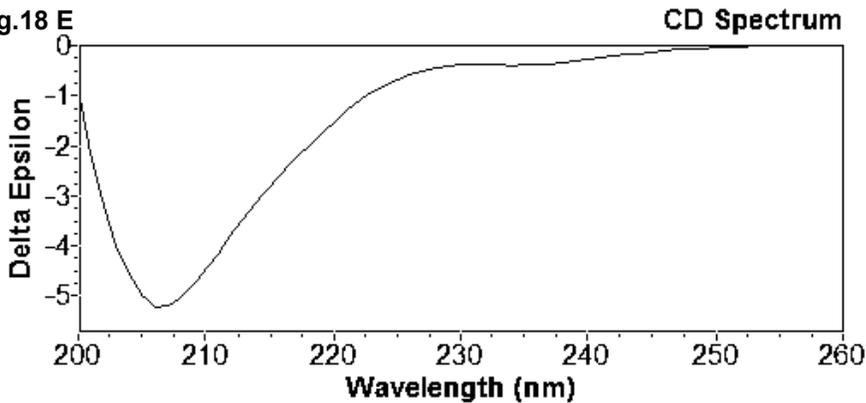
Helix	3,8 %
Antiparallel	46,1 %
Parallel	5,3%
Beta-Tur	19,3%
Rndm. Coil	35,3 %
Total Sum	109,8 %

Fig.18D

**Mut.3**

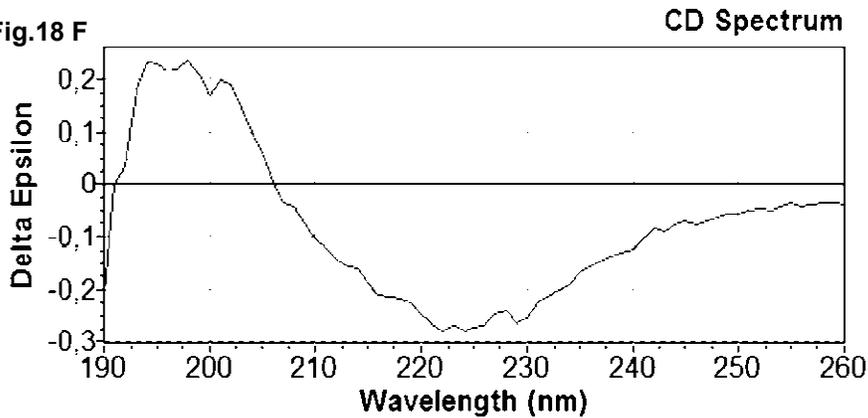
205-260 nm	
Helix	4,6 %
Antiparallel	42,2%
Parallel	5,3%
Beta-Tur	19,3%
Rndm. Coil	35,3%
Total Sum	107,2%

Fig.18 E

**Mut. 4**

210-260m	
Helix	n.d. 44,9 %
Antiparallel	5,8 %
Parallel n.d.	6,5 %
Beta-Turn	15,0 %
Rndm. Coil	26,2 %
Total Sum	98,3 %

Fig.18 F

**Mut.5**

205-260 nm	
Helix	4,2 %
Antiparallel	44,5 %
Parallel	5,3 %
Beta-Tur	19,2 %
Rndm. Coi	35,2 %
Total Sum	108,4 %

Fig. 18 Espectroscopia de Dicroísmo Circular. Gráficos plotados pelo programa CDNN, resultantes da transferência dos dados obtidos nos ensaios de Dicroísmo Circular (CD). Para as proteínas: LaRbp38 e mut4, foram encontradas maiores quantidades de estrutura α hélice do que folhas β . Já para os mutantes mut1, mut2, mut3 e mut5 a proporção de folhas β é muito superior a de α hélices. Em todas as proteínas a quantidade de regiões sem estrutura secundária ("random coil") aparece em proporção semelhante.

4.4. Verificação da identidade das proteínas recombinantes mutantes por espectrometria de massa

As proteínas recombinantes purificadas, LaRbp38 e os mutantes 1 a 4, foram tratadas com tripsina e os peptídeos tripticos gerados foram seqüenciados *de novo* por MALDI-TOF em colaboração com o Prf. Fabio Gozzo (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron- LNLS). As seqüências obtidas de diferentes peptídeos tripticos foram submetidas a análise em banco de dados públicos, incluindo o do genoma de *Leishmania major* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/L_major/). Os resultados obtidos confirmaram que os mutantes contém peptídeos específicos da proteína LaRbp38, confirmando assim os resultados apresentados nas Figs 16 e 17 e resumidos na tabela abaixo (Tabela 5).

OBS: Não foi realizado o seqüenciamento dos peptídeos referentes ao mut5, pois este mutante foi produzido após a realização deste experimento, e por problemas de agendamento do equipamento e de a mudanças nos procedimentos do LNLS, esse seqüenciamento não pôde ser concluído

Tabela 5. Resultados do seqüenciamento de peptídeos trípticos da proteína LaRbp38 e seus mutantes por Espectrometria de Massa (MALDI-TOF)

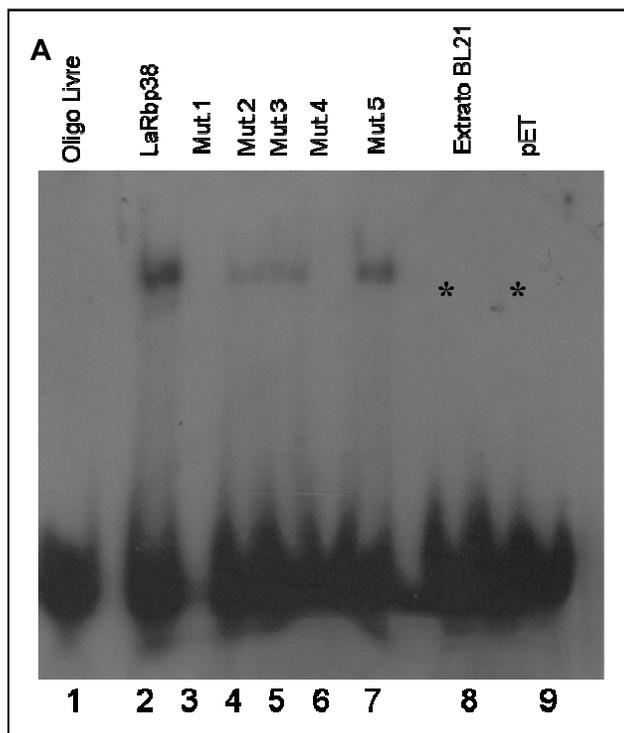
<p>Search title : Rbp38 Database : MSDB (3239079 sequences; 1079594700 residues) Protein hits : Q5QHV5 LEIAM: Rbp38p. - <i>Leishmania amazonensis</i>.</p>
<p>Search title : Mut 1 Database : MSDB (3239079 sequences; 1079594700 residues) Protein hits : Q5QHV5_LEIAM Rbp38p.- <i>Leishmania amazonensis</i>.</p>
<p>Search title : Mut2 Database : MSDB (3239079 sequences; 1079594700 residues) Protein hits : Q4QB87_LEIMA Mitochondrial RNA binding protein , putative.- <i>Leishmania major</i></p>
<p>Search title : Mut3 Database : MSDB (3239079 sequences; 1079594700 residues) Protein hits : Q5QHV5_LEIAM Rbp38p.- <i>Leishmania amazonensis</i>. Q86PT0_LEITA Mitochondrial RNA-binding protein RBP38.- <i>L. tarentolae</i></p>
<p>Search title : Mut4 Database : MSDB (3239079 sequences; 1079594700 residues) Protein hits : Q5QHV5_LEIAM Rbp38p. - <i>Leishmania amazonensis</i> .Q4QB87_LEIMA Mitochondrial RNA binding protein, putative.- <i>Leishmania major</i></p>

4.5. Mapeamento das regiões que contém o sítio de interação de ácidos nucléicos na proteína LaRbp38 recombinante usando mutantes deletoriais

Ensaio de mobilidade em gel (EMSA) foram usados para se testar a habilidade, dos diferentes mutantes em comparação a proteína LaRbp38, em formar complexos *in vitro* com as seguintes sondas: DNA telomérico simples fita rico em G, (Tel1) DNA de cinetoplasto (kDNA) e DNA telomérico dupla fita (LaTel), pois já se sabia anteriormente que LaRbp38 tem afinidade de interação com esses DNAs (Fernandez et al, 2004; Lira et al 2007c). Primeiramente foram realizados ensaios usando as proteínas LaRbp38 e seus cinco mutantes não purificadas em coluna HiTRAP Chelating; nestes ensaios Tel1 foi usado como sonda) (Fig. 19A). Os resultados mostraram a formação de complexos entre as proteínas LaRbp38 e os mutantes mut2, mut3, e mut5 e o oligonucleotídeo Tel1 usado como sonda (Fig. 19A, linhas 2, 4, 5 e 7). Como controle das

reações e para garantir que a interação dessas proteínas ao DNA não ocorria devido a algum tipo de contaminante presente nos extratos, foram utilizados extratos de BL21 e extrato bacteriano contendo o vetor pET28a+ vazio (Fig. 19A, linhas 8 e 9). Todas estas reações foram realizadas na presença de 10 ng do competidor inespecífico poly (dl-dC) de forma a evitar a formação de complexos inespecíficos proteína:DNA.

Estes resultados sugerem que o sitio de ligação dessas proteínas ao DNA telomérico simplificado rico em G (Tel1) está localizado na porção mediana da proteína, mais precisamente em uma região onde os mutantes 2, 3 e mut 5 se sobrepõe (veja diagrama na Fig.24 para detalhes). Estes resultados foram confirmados utilizando-se as proteínas purificadas em coluna HiTRAP Chelating e os DNAs teloméricos Tel1 e LaTel, além do DNA de cinetoplasto (kDNA) (Figs.19 B, C e D). Nestes ensaios pudemos observar a formação de complexos entre as proteínas LaRbp38 inteira, os mutantes mut2, mut3 e mut5 e a sonda Tel1 (Fig.19 B, linhas 2 a 5 confirmando os achados mostrado na Fig. 19A). Estas proteínas também formaram complexos com LaTel (Fig 19.C, linhas 2, 3, 4 , 5 e 7) e com kDNA (Fig.19 D, linhas 2, 3, 4, 5 e 6) sendo que o mut1 aparece interagindo fracamente com kDNA e LaTel (Figs. 19 C, linha 3 e 19 D, linha 3).



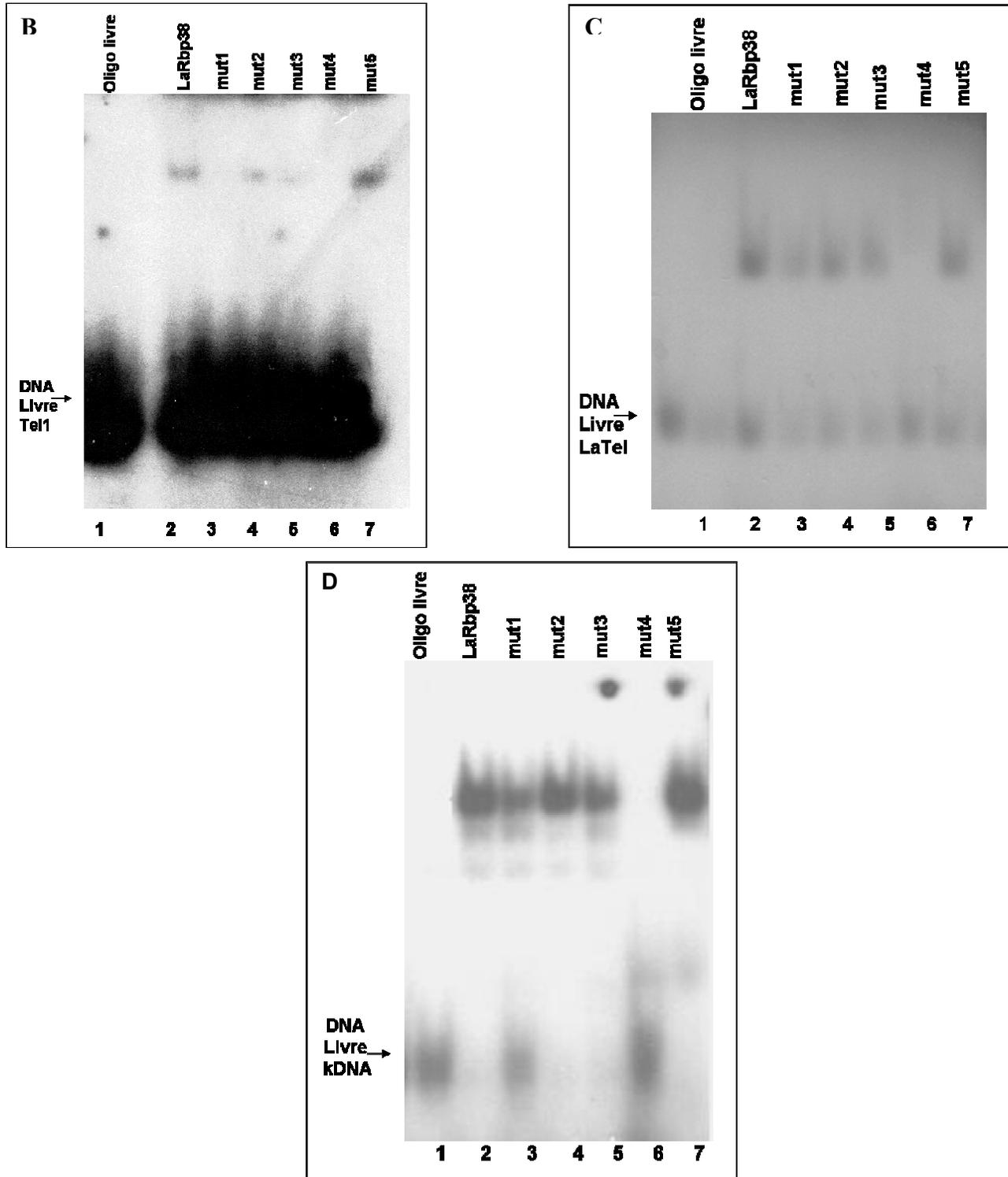


Fig. 19 Mapeamento das regiões que contém o provável sítio de interação com DNA em LaRbp38. Em A-D os ensaios (EMSA) foram realizados com as proteínas recombinantes LaRbp38 e os mutantes mut1-5 e os complexos formados entre estas proteínas e os diferentes DNAs foram fracionados em gel não denaturante 4-6%. Em B-D) os ensaios EMSA foram realizados com as proteínas recombinantes purificadas em colunas HiTrap Chelating. A) EMSA das proteínas

LaRbp38 e seus 5 mutantes antes da purificação. EMSA realizados com oligonucleotídeo Tel1 e as proteínas LaRbp38 (linha 2), mut1, mut2, mut3, mut4 e mut5 não purificadas (linhas 2 a 7). Os asteriscos indicam os controles usados para essa reação sendo eles, extratos de *E. coli* BL21 e de *E. coli* BL21 transformada com vetor pET 28a+ vazio, respectivamente (linhas 8 e 9). B) EMSA usando Tel1 como sonda e as proteínas recombinantes purificadas em coluna HiTrap Chelating. Podemos observar a formação de complexos entre Tel1 e LaRbp38, mutantes 2, 3 e 5 (linhas 2 a 5). C) EMSA realizado com LaTel como sonda e as proteínas recombinantes purificadas em coluna HiTrap Chelating.. Podemos visualizar a formação de complexos com LaRbp38, mutantes 1, 2, 3 e 5 (linhas 2, 3, 4, 5 e 7). D) EMSA realizado com kDNA e as proteínas recombinantes purificadas em coluna HiTrap Chelating, onde também vemos a formação de complexos com LaRbp38 e os mutantes 1, 2, 3 e 5 (linhas 2, 3, 4, 5 e 7, respectivamente).

A análise quantitativa dos resultados apresentados na Figs.19 B-D, foram plotados no gráfico mostrado na Fig. 20. Os resultados mostraram que LaRbp38 inteira apresenta uma maior afinidade de interação com Tel1 (23%) comparada à afinidade pelos DNAs LaTel e kDNA (21% para ambos). Em relação ao mut2 a maior afinidade de interação é com o kDNA (35%) seguido de LaTel (34%) e Tel1 (20%). O mut3 interagiu preferencialmente com LaTel (60%), enquanto que a atividade de ligação ao kDNA foi ligeiramente mais alta (23%) que com Tel1 (21%). O mut5 mostrou maior afinidade ao kDNA (45%), seguido de LaTel (35%) e Tel1 (21%). O mut1 mostrou 10% de atividade de interação com o kDNA e somente 4,5% de atividade de ligação com LaTel sugerindo que ele ainda contém uma parte do domínio responsável por interagir com os diferentes DNAs testados, presente provavelmente na região de sobreposição com o mut2 (veja Diagrama na Fig.24 para detalhes).

Contudo, já que a proteína LaRbp38 inteira apresenta um domínio de ligação a DNA até agora não identificado os ensaios acima só mostraram que a proteína inteira tem preferência por Tel1, enquanto os mutantes 2 e 5 têm maior afinidade pelo kDNA e o mut3 liga preferencialmente LaTel.

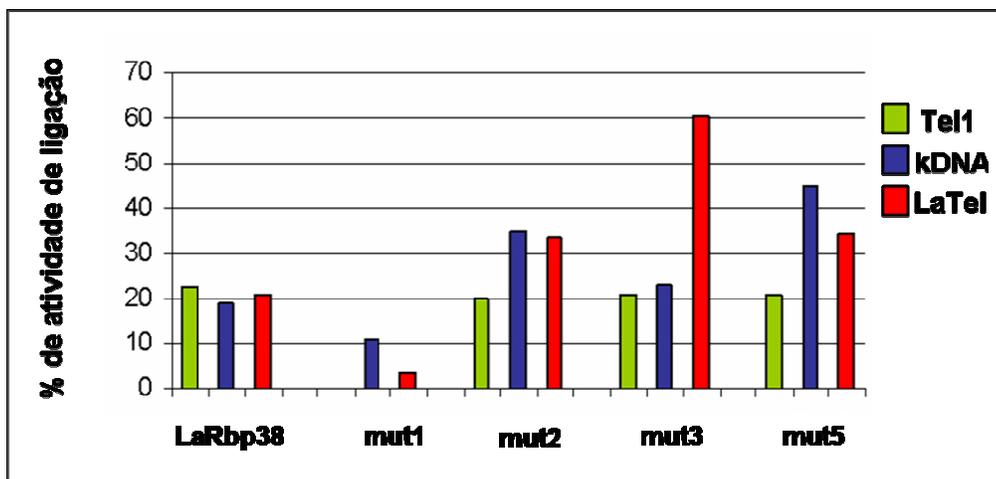


Fig. 20 Porcentagem de atividade de interação de LaRbp38 e seus mutantes com as diferentes sondas testadas: Tel1, LaTel e kDNA.. Os resultados seguem-se por LaRbp38, mut1, mut2 , mut3, mut5 com as sondas Tel1, kDNA e LaTel respectivamente.

Ensaio de competição foram realizados a fim de se confirmar os achados mostrados nas Figs. 18 e 19 e determinar quantitativamente a especificidade da interação entre as proteínas e os diferentes DNAs testados. Neste caso, optou-se por utilizar as proteínas não purificadas (Matérias e Métodos, item 3.9.2) por que estas se mostraram mais estáveis durante as inúmeras manipulações, comparado a baixa estabilidade apresentada pelas proteínas purificadas em coluna Hi-trap Chelating, mesmo estando estas armazenadas por poucos dias a 4 °C (dados não mostrados).

Nos ensaios de competição utilizou-se um excesso de 50X mais (50 pmol) de cada competidor frio por reação versus cada um dos DNAs marcados (1 pmol) usados como sondas. Além dos DNAs para os quais a proteína LaRbp38 tem afinidade comprovada *in vitro* e *in vivo* (LaTel, Tel1 e kDNA) , utilizou-se como competidor inespecífico um DNA não telomérico e não relacionado a DNA mitocondrial, o oligonucleotídeo simples fita denominado NonTel (Tabela 2).

Foi possível observar que nos ensaios de competição usando Tel1 como sonda, ocorreram diminuições de aproximadamente 30 a 80% na formação de complexos entre Tel1 e as proteínas LaRbp38 e os mutantes mut2, mut3 e mut5, na presença dos competidores LaTel, kDNA, NonTel e Tel1, respectivamente. Podemos notar que tanto LaRbp38, quanto os mutantes 2, 3 e 5 apresentaram afinidade semelhante a todos os DNAs testados, embora, neste caso, a afinidade da

proteína LaRbp38 a Tel1 foi um pouco maior quando comparada as demais. Podemos notar uma diminuição na porcentagem de interação de todas as proteínas com Tel1 na presença de todos os competidores testados. Em relação a LaRbp38 a maior diminuição na formação do complexo com Tel1 se deu quando usados os competidores Tel1 (específico) e NonTel (não específico), já quando utilizado LaTel como competidor essa diminuição foi de apenas 50%. A diminuição de interação dos mut2 e mut5 com Tel1 ocorreu de forma bastante semelhante principalmente com o uso do competidor NonTel, já para mut3 isso ocorreu de forma um pouco diferente em relação principalmente ao competidor LaTel onde a formação de complexo do mut 3 a Tel1 diminuiu apenas 25%. Esses resultados podem sugerir a existência de sítios de interação diferentes para Tel1 e para LaTel e kDNA, sendo que o sítio da proteína que interage com Tel1 não parece muito específico já que ocorreu competição com o DNA NonTel. (Fig.21)

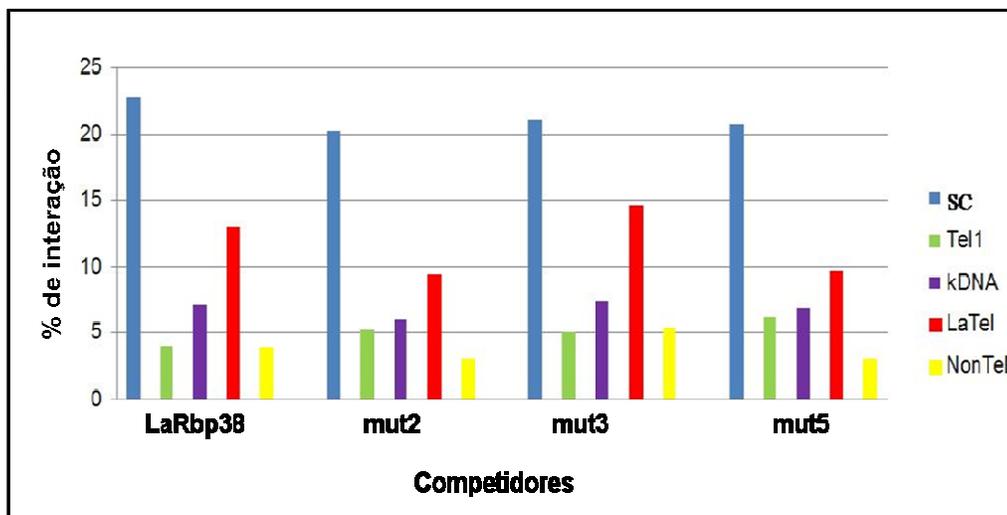


Fig. 21 Ensaio de Competição usando como sonda Tel1. O gráfico demonstra as porcentagens de atividade de interação de LaRbp38, mutantes 2, 3 e 5, na ausência (SC) e na presença de excesso (50X) dos competidores Tel1, Latel, kDNA e DNA não telomérico (NonTel) em relação a sonda Tel1 marcada radioativamente. As barras em azul representam as porcentagens de atividade de ligação sem o competidor (SC).

Nos ensaios usando LaTel como sonda, pudemos observar uma diminuição de 15% a 85% na formação dos complexos entre LaTel e as proteínas LaRbp38 e seus mutantes mut2, mut3 e mut5, na presença dos respectivos competidores kDNA, LaTel, Tel1 e NonTel (Fig.22). Na ausência de competidores, observamos interações de grau diferente entre LaRbp38 e os mut2, mut3 e mut5 e

LaTel. Curiosamente, comparados a proteína inteira, os mutantes mut2 e mut5 tiveram seus complexos inibidos na mesma proporção (~30%) na presença de todos os competidores testados. No caso do mut3, esta inibição foi maior e na ordem de 84% independente também do competidor usado. No caso de LaRbp38, a atividade não foi reduzida na presença do competidor kDNA e ocorreu uma redução de 14% na presença do competidor específico LaTel. Já na presença de Tel1 e NonTel, a atividade diminuiu em aproximadamente 50%, sugerindo uma forte interação de LaRbp38 a LaTel sendo que o sítio de interação com LaTel em LaRbp38 e nos mut2, mut3 e mut5 deve se sobrepor aos demais ou seja, um sítio único deve interagir com especificidades um pouco diferentes a todos os DNAs testados.

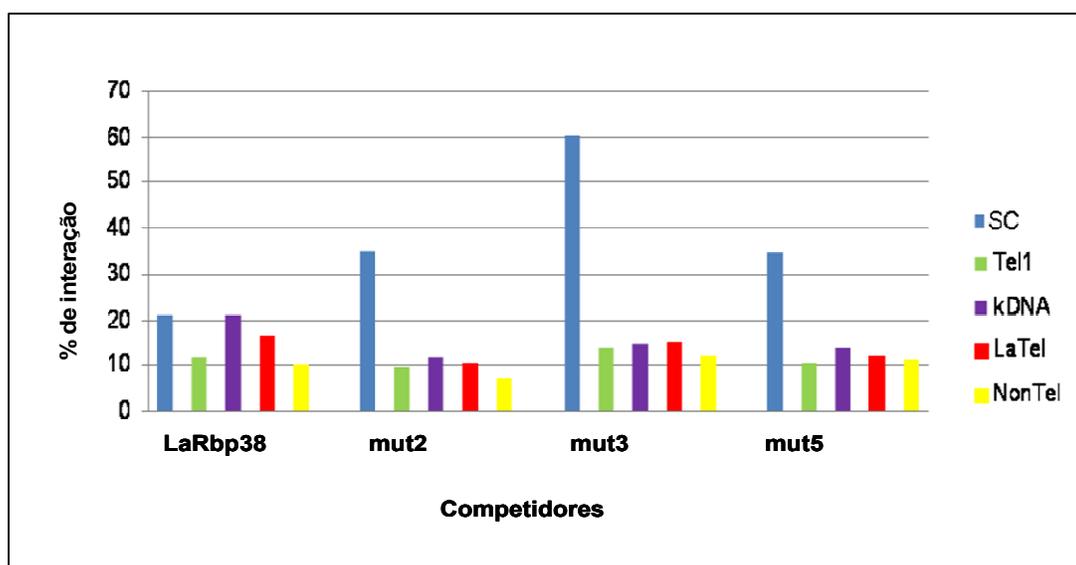


Fig.22 Ensaio de competição usando como sonda LaTel. Gráfico mostrando a análise quantitativa de ensaios de competição entre os competidores Tel1, Latel, kDNA e NonTel e reações contendo LaTel como sonda. Os ensaios de interação foram realizados com as proteínas LaRbp38 e os mutantes 2, 3 e 5. As barras em azul representam ensaios realizados sem competidor (SC).

Nos ensaios usando kDNA como sonda (Fig. 23), observamos uma diminuição de 20% a 94%, na formação dos complexos formados por kDNA e as proteínas LaRbp38 e seus mutantes: mut2, mut3 e mut5. Pudemos notar que LaRbp38 e os mutantes 2, 3, e 5 também apresentam afinidade a kDNA e que esta se apresenta de forma diferente quando confrontada com DNAs testados como competidores. Em relação a LaRbp38 a porcentagem de inibição da formação de complexo com

kDNA parece ser igual diante de todos os competidores testados (~ 80%). Para mut2 os níveis de inibição foram ainda maiores principalmente quando usado o competidor LaTel (94%), sendo que nenhum competidor foi capaz de diminuir significativamente a formação de complexo de mut 2 a kDNA a sugerindo a especificidade da interação de mut2 a kDNA. Já para o mut3 esse resultado foi diferente, ou seja, as porcentagens de inibição na formação de complexo com kDNA na presença dos competidores Tel1, kDNA e NonTel não passaram de 10% enquanto que para Latel não houve competição e sim um aumento na interação com kDNA, este último provavelmente resultante de algum erro ocorrido durante o ensaio, sugerindo que a ligação do mut3 a kDNA é bastante forte. Par mut5 houve uma diminuição de até 75% na interação ao kDNA na presença dos diferentes competidores sendo que o competidor kDNA (competidor específico) foi o que menos competiu com a sonda kDNA.

Estes resultados confirmam em parte os resultados apresentados na figura 20 onde os mutantes 2 e 5 apresentam maior afinidade a kDNA, porém a baixa inibição na formação de complexo entre o mut3 e kDNA sugere que os sítios kDNA e LaTel se sobrepõe em uma região do mut3 provavelmente compreendida entre os aminoácidos 235 a 283, a qual coincidentemente não se sobrepõe a regiões contidas em nenhum outro mutante (ver diagrama na Fig. 24 para detalhes).

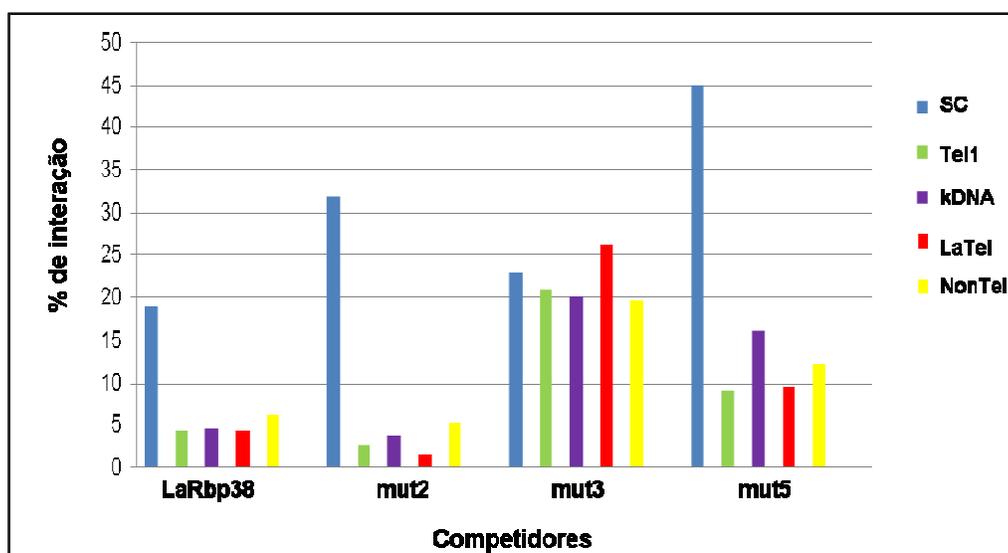


Fig.23 Ensaio de competição usando como sonda kDNA. Gráfico mostrando a análise quantitativa de ensaios de competição entre os competidores Tel1, Latel, kDNA e NonTel e kDNA usado como sonda, em ensaios de interação com as proteínas LaRbp38 e os mutantes 1, 2, 3 e 5. As barras em azul representam ensaios realizados sem competidor (SC).

Os resultados de competição, portanto, nos mostram que todas as proteínas (LaRbp38 e seus mutantes 2, 3 e 5), apresentam atividade de ligação aos DNAs testados (Tel1, LaTel e kDNA), embora existam preferências diferentes entre as proteínas mutantes e a proteína inteira a determinados DNAs. LaRbp38 apresenta maior afinidade por Tel1, o que está condizente com resultados obtidos por Lira et al, enquanto os mutantes mut2, mut5 têm afinidades semelhantes aos três DNAs e uma preferência maior ao kDNA, enquanto o mut3 parece ligar igualmente kDNA e LaTel. Isso pode estar ocorrendo devido à presença de mais de um sítio de ligação a diferentes DNAs em um mesmo mutante, ou seja, tanto LaRbp38, quanto os demais mutantes, apresentam sítios de ligação tanto para Tel1, kDNA, LaTel quanto para DNA não telomérico (NonTel). O mut3 por exemplo, interage com os 3 DNAs porém, e com maior afinidade a LaTel e kDNA. Reunindo os experimentos de interação e os de competição cruzada, foi possível deduzir que a interação de mut3 com kDNA se concentra na porção mais C-terminal da proteína (vide figura 24). A baixa afinidade de mut1 a kDNA e LaTel, quando comparados os resultados com os demais mutantes e LaRbp38, parece irrelevante e acreditamos que essas interações sejam devidas somente a uma pequena porção no C-terminal deste polipeptídeo, que compreende os aminoácidos 95 a 141 da LaRbp38, que possivelmente faz parte do domínio/sítio de interação com os DNAs. Lembrando que esta mesma porção de LaRbp38 se trata exatamente da região onde os mutantes mut1 e mut2 se sobrepõem confirmando em parte esta hipótese (Fig.24).

Juntando estes resultados propomos que o domínio de ligação de LaRbp38 aos DNAs testados, seja do tipo estrutural, e por isso somente ensaios de modelagem molecular e futuramente de cristalografia na presença de DNA é que poderá comprovar nossa hipótese.

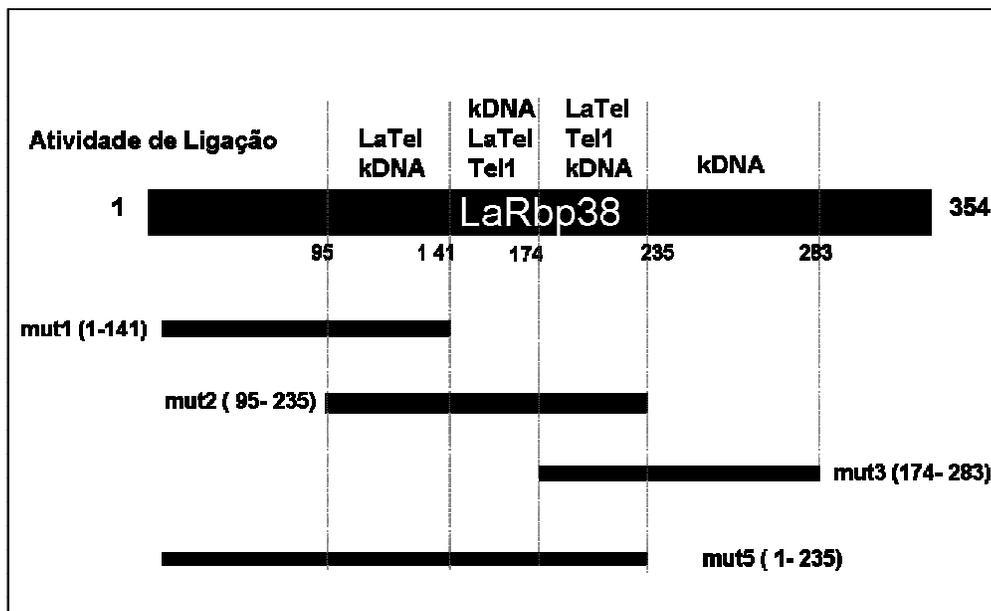


Fig. 24 Representação esquemática mostrando os mutantes truncados construídos a partir de LaRbp38 (mut1-5) e a possível localização do domínio de interação a diferentes DNAs . kDNA (DNA de cinetoplasto), Tel1 (DNA telomérico simples fita rico em G), LaTel (DNA telomérico na forma de dupla fita), estão dispostos na figura de acordo com ordem de preferência de ligação aos diferentes mutantes. Os números correspondem a posição em aminoácidos de cada mutante nas cadeias polipeptídicas. O Mutante 4 não está representado, pois não apresenta atividade de interação *in vitro* com os DNAs testados.

4.6. Expressão de LaRbp38 e seus mutantes usando reticulócito de coelho

Os ensaios de transcrição/tradução *in vitro* usando extrato de reticulócitos de coelho, foram realizados com o uso do Kit TnT Quick Coupled Transcription/ Translation Systems(Promega) que permite a expressão de proteínas cujos genes estejam sob o comando de um promotor T7, no caso o promotor T7 se encontra rio acima ao primeiro ATG de cada gene clonado no vetor pET28a+.

As proteínas traduzidas *in vitro* foram testadas por *Western blotting* usando soro anti-LaRbp38 produzido em camundongo (dados não mostrados) Em seguida, os extratos contendo as proteínas LaRbp38 e mutantes de 1 a 5 traduzidas foram submetidos a ensaio de interação proteína-DNA (EMSA), utilizando-se como sonda Tel1 (Fig. 25, linhas 4 a 9). Como controle do ensaio utilizou-se extrato de reticulócito e extrato de reticulócito transformado com vetor pET 28a+ vazio (Fig. 25, linhas 2 e 3).

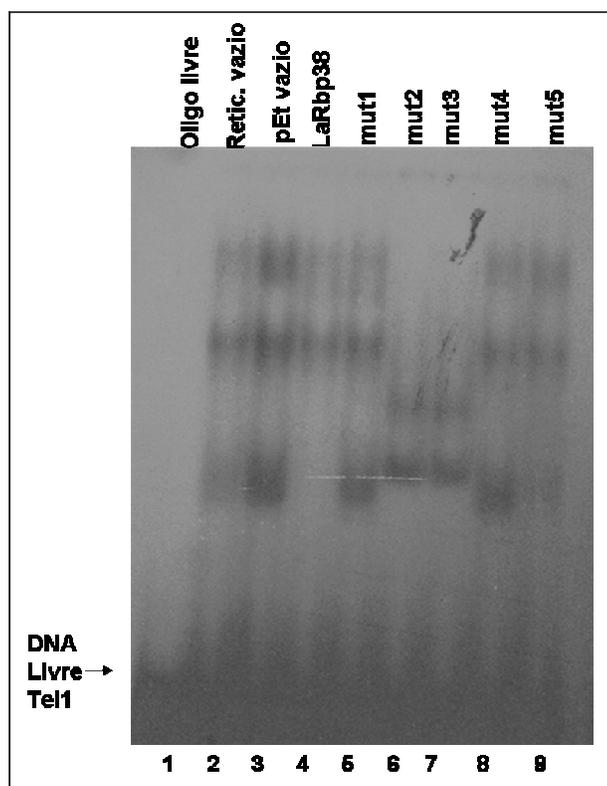


Fig. 25 EMSA utilizando proteínas traduzidas a partir de extratos de reticulócito de coelho. EMSA realizado com as proteínas LaRbp38 e seus 5 mutantes expressos em reticulócito de coelho, as linhas 2 e 3 correspondem aos controles da reação (reticulócito vazio e reticulócito expresso com pET vazio), as linhas de 4 a 9 correspondem as proteínas LaRbp38, mut1, mut2, mut3, mut4 e mut5 respectivamente.

Os resultados mostram o sucesso da expressão já que podemos notar um complexo formado entre Tel1 e as proteínas LaRbp38 e os mutantes 2, 3 e 5 repetindo-se os resultados desse mesmo ensaio feitos com proteínas produzidas por expressão em sistema bacteriano (*E.coli* BL21). Esse resultado é baseado comparando-se os complexos formados entre os controles e as amostras que contém LaRbp38 e os mutantes (Fig. 25, linhas 4 a 9). Aqui é possível observar que LaRbp38 (Fig.25, linha 4) e os mutantes 2, 3 e 5(Fig.25, linhas 6,7 e 9) apresentam um perfil diferente do mut1 e mut4 (Fig.25, linhas 5 e 8) em que o perfil da corrida é igual aos dos controles (Fig.25, linhas 2 e 3) usados na reação.

4.7. LaRbp38 é expressa no núcleo e nas mitocôndrias de *Leishmania amazonensis*

Resultados anteriores de nosso laboratório e de outros grupos (Lira et al, 2007 e Liu et al 2007) sugeriam que a Rbp38 é uma proteína multifuncional, podendo cumprir funções em duas organelas. No núcleo interagindo com DNA telomérico e com DNAs ricos em GT (Lira et al 2007) e no cinetoplasto, interagindo com a maquinaria de replicação dos DNAs de mini-circulo (Liu et al 2007). Porém, nem nosso grupo e nem outros pesquisadores de outros laboratórios haviam conseguido mostrar que esta proteína realmente se encontra presente nas duas organelas, usando ensaios de imunofluorescência indireta e *Western blotting*.

Portanto, resolvemos padronizar a obtenção de extratos protéicos subcelulares de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, para mostrar que a proteína LaRbp38 está realmente presente, tanto no núcleo, quanto na mitocôndria (cinetoplasto). Para tal, extratos obtidos de frações subcelulares do parasita, foram submetidos a fracionamento em gel SDS -PAGE 12% e transferidos para uma membrana de nitrocelulose. As proteínas foram reveladas usando soro anti-LaRbp38 na diluição 1 : 1000. Esse ensaio mostrou que a proteína Rbp38 em *Leishmania amazonensis*, é expressa tanto na sua fração nuclear quanto na fração mitocondrial (Fig.26, linhas 2 e 3). Podemos também verificar que o soro anti-LaRbp38 foi capaz de reconhecer uma segunda banda de migração mais lenta em todos os extratos estudados. A presença desta banda pode sugerir que o anticorpo está reconhecendo outras proteínas inespecificamente ou então que a LaRbp38 pode sofrer alguma modificação pós-tradução nesses parasitas, ou até que esta banda represente um complexo entre a Rbp38 e DNA, cuja interação é tão forte que não é capaz de ser destruída pelo calor ou agentes redutores presentes no tampão de carregamento do gel.

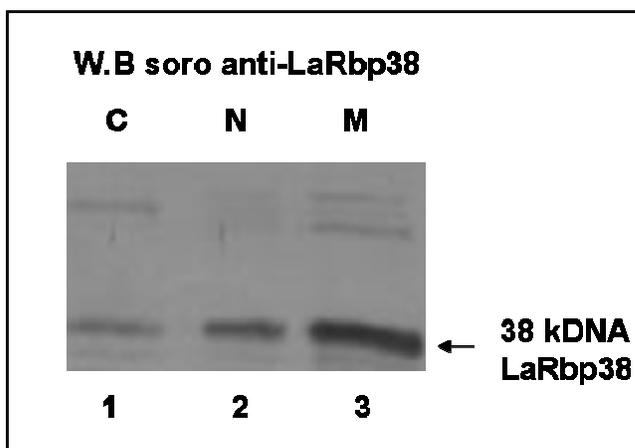


Fig. 26 A A proteína LaRbp38 é expressa no citoplasma, núcleo e no cinetoplasto de *L. amazonensis*

Western blotting, contendo aproximadamente 8µg de cada um dos extratos. C (citoplasma), N (núcleo) e M (mitocôndria), foram revelados com soro anti-LaRbp38, na diluição 1:1000. Os resultados mostram que Rbp38 está presente nas três frações obtidas de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Para comprovar a qualidade dos extratos utilizados e que eles não estão contaminados cruzadamente, foi realizado um *Western blotting* usando os mesmos extratos e como controle o soro anti-LaTRF, que reconhece especificamente uma proteína nuclear presentes nos telômeros do parasita, a proteína LaTRF, homóloga funcional as proteínas TRF1 e TRF2 de humanos (Bibo et al; 2005). Na Fig.26 B (linhas 2) é possível observar que a LaTRF só é revelada no extrato de núcleo, confirmando a especificidade dos extratos subcelulares produzidos.

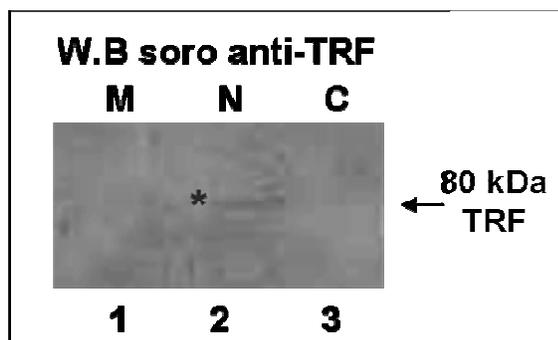


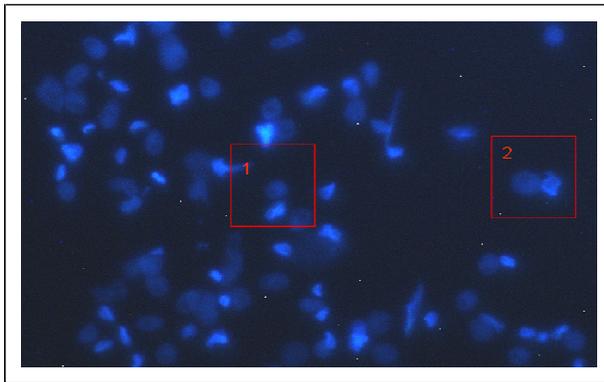
Fig. 26 B Western blotting confirmando a qualidade dos extratos de Núcleo, citoplasma e mitocôndria. Extratos de mitocôndria, núcleo e citoplasma respectivamente, revelados com soro anti-TRF2. Mostrando a qualidade dos extratos produzidos, já que TRF é uma proteína exclusivamente nuclear

4.7.1 Confirmação da sub-localização celular de LaRbp38 por imunofluorescência indireta

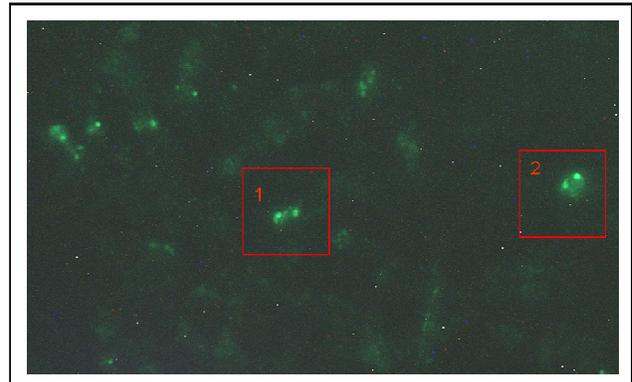
Resultados de ensaios de imunofluorescência indireta utilizando formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* cultivadas em fase exponencial de crescimento, obtidos de cultura não sincronizada, foram incubados com soro anti-LaRbp38 como anticorpo primário e revelados com Alexa Flúor 488(verde). Os resultados obtidos nas imagens mostradas nas Figs. 27A-F, demonstram a presença de LaRbp38 tanto no cinetoplasto (Fig. 27B) quanto no núcleo (Fig.27E), e na sobreposição das imagens (Fig. 27C e F). Note que a maioria dos parasitas (~90%) apresenta a proteína no cinetoplasto, em imagens pontuais em dois pólos da organela, como

anteriormente mostrado por Liu et al (2006). Estes autores observaram que a proteína homóloga de *Trypanosoma brucei*, a TbRbp38, estava presente somente no cinetoplasto desses parasitas. Nas imagens mostradas na Fig. 27, é possível notar, a LaRbp38 no núcleo, coradas com alexa fluor na cor verde, que apresenta-se como pontos brilhantes, enquanto a coloração com vectashield apresenta-se na coloração azul corando nucleo e cinetoplasto, sendo este mostrado com uma coloração de azul mais intenso, quando comparado ao nucleo.

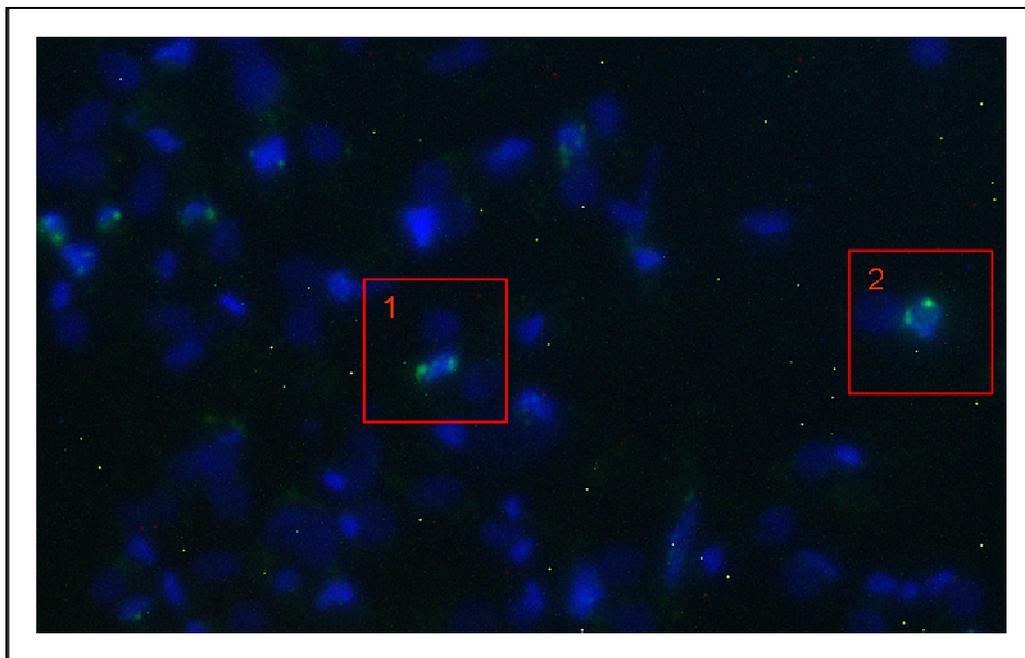
A) Vectashield



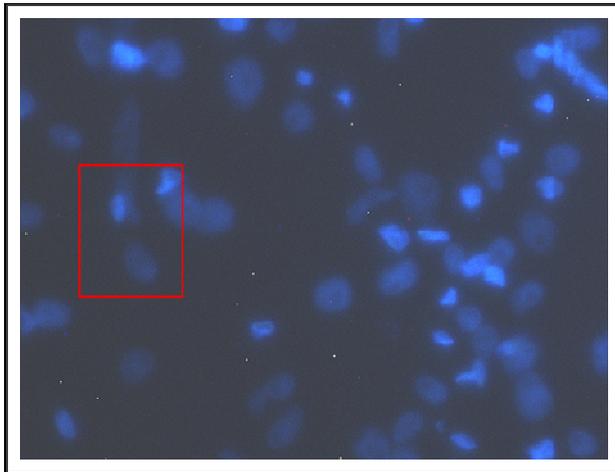
B) Alexa Fluor (Verde)



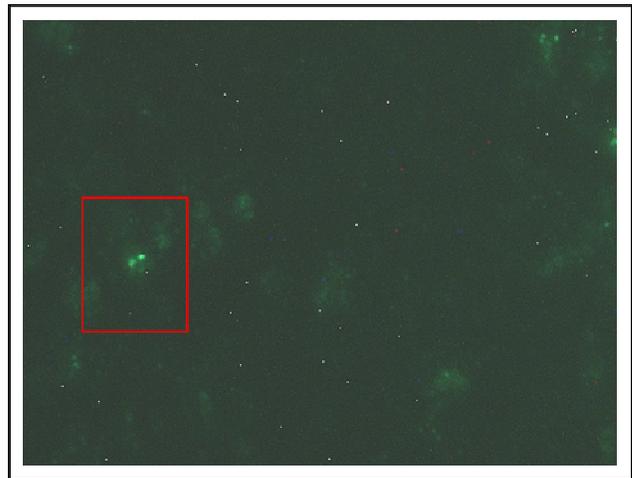
C) Vectashield + Alexa Fluor



D) Vectashield



E) Alexa Fluor (Verde)



F) Vectashield + Alexa

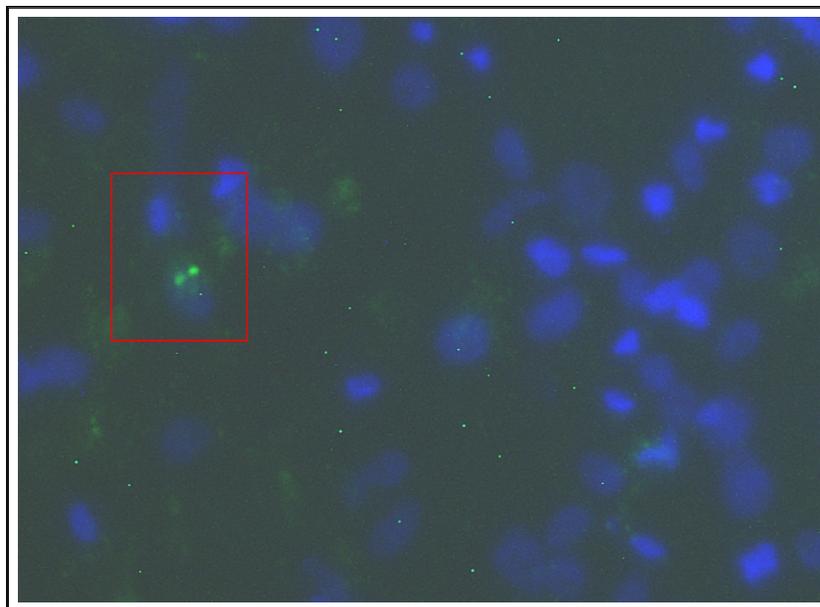
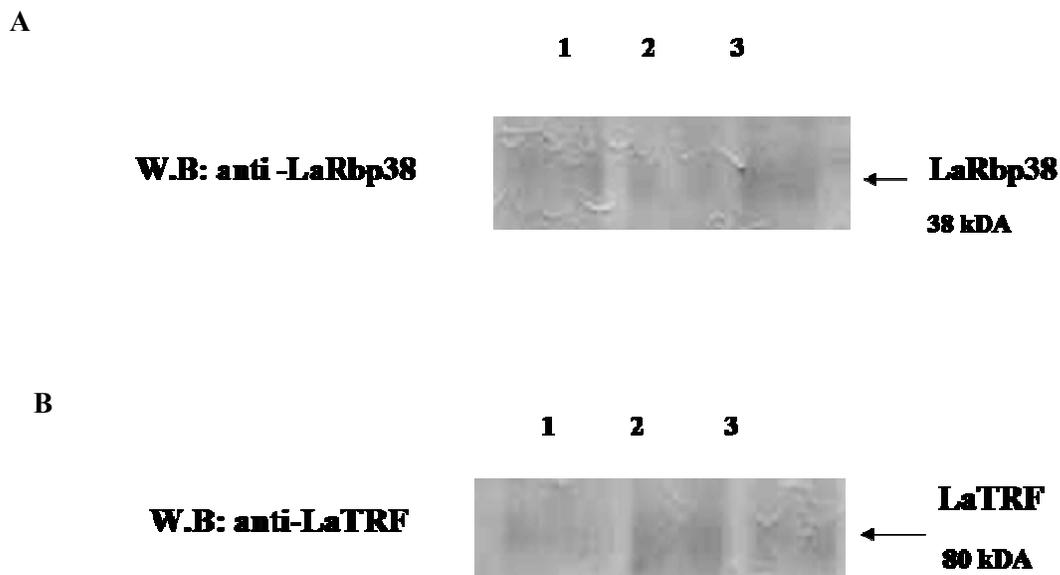


Fig. 27 Localização subcelular de LaRbp38 mostrando a proteína no cinetoplasto e no núcleo de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Em A) parasitas corados com Dapi (azul), em B) Alexa Fluor X (verde), mostrando a presença de LaRbp38 no cinetoplasto das células. C) sobreposição das imagens de Dapi e Alexa fluor, confirmando a localização sub-celular de LaRbp38 no cinetoplasto de *L. amazonensis*. Em D) parasitas corados com vectashield (azul), em E, Alexa Fluor Alexa Fluor 488 (verde), mostrando a presença de LaRbp38 no núcleo do parasita. F) sobreposição das imagens de Dapi e Alexa fluor, mostrando LaRbp38 localizada no núcleo de *L. amazonensis*.

4.8. Identificação de proteínas parceiras de LaRbp38 em extratos de núcleo de *L. amazonensis*: Resultados preliminares

Foram realizados ensaios de imunoprecipitação usando-se o Kit Seize X Protein A Immunoprecipitation (Pierce Thermo Scientific), seguindo as especificações do fabricante, a partir de extratos da fração nuclear previamente padronizado no laboratório (vide Fig. 25). A proteína nativa LaRbp38 foi imunoprecipitada usando-se soro anti-LaRbp38 produzido em coelho. Os três eluatos da imunoprecipitação foram submetidos a ensaios de Western blotting revelados com os soros anti-LaRbp38, anti-LaTRF e anti-LaRPA (Fig. 28A-C). Os resultados mostraram que as proteínas LaRbp38, LaTRF e LaRPA-1 são eluídas juntas nos 3 eluatos , sugerindo que elas formem parte de um mesmo complexo protéico no núcleo dos parasitas (Fig. 28 A, linha 1, a 3 , Fig. 28 B, linhas 1a 3 Fig. 28 C, linhas 1 a 3). Ensaios de imunoprecipitação cruzada usando os soros anti-LaTRF e anti-LaRpa-1 seguido de *Western blotting* revelado com soro anti-LaRbp38 estão em andamento de forma a confirmar estes resultados.



C

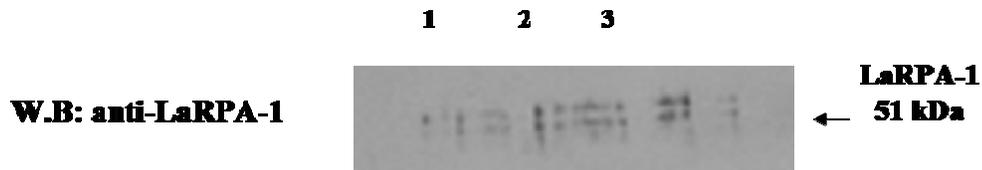


Fig. 28 LaRbp38 pode formar parte de um mesmo complexo que contém as proteínas teloméricas LaRpa-1 e LaTRF. Em A-C, eluatos de imunoprecipitação de extrato de núcleo de *L. amazonensis* com soro anti-LaRbp38 foram submetidos a ensaios de Western blotting revelados com: A) soros anti-LaRbp38, linhas 1 a 3. B) soro anti-LaTRF, linhas 1 a 3. C) soro anti-LaRpa-1, linhas 1 a 3. Em A-C os números de 1 a 3 correspondem aos eluatos da imunoprecipitação com soro anti- LaRbp38.

Os mesmos eluatos da imunoprecipitação mostrados na Fig. 28 (A-C), foram submetidos a análises por espectrometria de massa, para identificação, pelo método do “shotgun”, dos peptídeos mais abundantes que foram eluídos juntamente com LaRbp38 durante a imunoprecipitação. Para esta análise utilizou-se o programa MASCOT e comparação de seqüências usando os bancos de dados públicos e do projeto genoma *L. major* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/L_major/). Dentre as proteínas eluídas encontram-se algumas de citoesqueleto, chaperonas e inclusive proteínas que têm papel na maquinaria de replicação do DNA, tais como: ribonucleases, helicases, ATPases, ligases entre outras (vide Tabela 6 para detalhes). A veracidade destes resultados será confirmada por ensaios de imunoprecipitação com diferentes soros e com novos sequenciamentos.

Tabela 6: Resultados das análises comparativas em banco de dados públicos e de *L.major* dos seqüenciamento dos peptídeos que compunham a mistura dos eluatos da imunoprecipitação de extrato nuclear de *L.amazonensis* com soro anti-LaRbp38. Na coluna numero 5 encontram-se o número de peptídeos seqüenciado de cada proteína presente na mistura.

Numero acesso no GenBank	Nome da proteína	Score	Probabilidade	Nº de peptídeos sequenciados
AAL57850.1	Ribonuclease HII	32	0.992	7
O43938	S-adenosylmethionine synthetase	28	0.998	4
CAB97733.1	Possible f15b9.5 protein	33	0.9998	4
CAB97718.1	Possible auxin-induced basic helix	31	0.99993	4
CAB97691.1	Possible microtubule-associated prote	32	0.993	4
CAC59844.1	Possible DNA-dependent ATPase snf2h	29	0.997	4
CAB95265.2	Alpha tubulin, copy 2	32	0.998	4
Q6YIR8	Possible TC40 antigen	37	0.94	4
CAB97691.1	Possible microtubule-associated protein	32	0.993	4
Q4Q0H6	Kinetoplast-associated protein	38	0.94	3
Q4Q5L3	Ubiquitin-conjugating enzyme	29	0.98	3
Q4QGW1	S-phase kinase-associated protein	39	0.98	3
Q4QD95	Actin-related protein 2, putative	32	0.99	3
Q4Q5A7	Coatomer epsilon subunit, putative	30	0.992	3
Q4Q7P9	Spliceosome-associated protein, putative	42	0.998	3
Q4Q0P3	Helicase, putative	46	0.9990	3
Q8WSZ0	Ribonuclease HII	32	0.9997	3
Q8I6Y3	Proteasome subunit beta type	37	0.9998	3
Q6YIR8	20S proteasome beta 7 subunit	37	0.94	3
CAB97769.1	Probable possible dynein heavy chain	30	0.993	3
7494066	Probable membrane protein L5701.5	46	0.83	3
Q4QCR1	Coatomer beta subunit, putative	45	0.999	3
AAK14904.1	Ribosomal protein S11	38	0.87	3
1QB7	Chain A, Crystal Structures of Adenine	27	0.995	3
CAC00927.1	Probable DNA ligase	35	0.92	2
CAB98658.2	Probable surface antigen p2 precursor	29	0.98	2
Q4Q2Y6	NAD dependent deacetylase, putative	38	0.9995	2
CAB72302.2	Serine hydroxymethyltransferase	41	0,99	2
CAB98162.1	RAB5-like protein	29	0.88	2
CAB98069.1	Probable heat shock protein 70-relate	32	0.9998	2
CAB97851.1	Possible p-glycoprotein	32	0.991	2
AAC37295.1	Adenine phosphoribosyltransferase	27	0.996	1
AAA18826.1	GTP-binding protein homologue	35	0.9992	1
CAB86699.1	Putative cytochrome c oxidase subunit	33	0.9998	1

5. Discussão

A proteína Rbp38 foi descrita inicialmente, como uma proteína estabilizadora de RNAs no cinetoplasto de *L. tarentolae* e *T. brucei* (Sbicego et al., 2003) e mais recentemente teve seu papel descrito na maquinaria de replicação de minicírculos do kDNA de *T. brucei* (Liu et al., 2006). Em 2003, foi demonstrada a existência de uma proteína denominada Tc38, de aproximadamente 38kDa, em extratos nucleares de *T. cruzi*. Esta apresenta alta identidade e similaridade com a Rbp38 descrita em *L. tarentolae* e *T. brucei*, e é capaz de se associar *in vitro* com a seqüências poli (dTdG) encontradas em regiões intergênicas neste parasita (Duhagon et.al, 2003). No ano seguinte, uma proteína de 38 kDa foi isolada em extratos totais e nucleares de *L. amazonensis*, purificados em colunas de afinidade contendo DNA telomérico rico em G como ligante (Fernández et al.2004). Esta proteína foi identificada por espectrometria de massa e seqüenciamento *de novo*, como sendo homóloga a Rbp38 de *L. tarentolae* e *T. brucei*. Após esses achados foram realizados ensaios de interação proteína-DNA *in vitro* e *in vivo*, que demonstraram que a LaRbp38 é capaz de interagir não só com a fita telomérica rica em G dos telômeros de *L. amazonensis*, mas também com a dupla fita telomérica, com DNAs ricos em GT na forma de dupla fita e com a seqüência de início de replicação dos mini-círculos de kDNA (Liu et al., 2006, Lira et al., 2007c).

Já foi mencionado que LaRbp38 não compartilha domínios funcionais ou estruturais ou quaisquer semelhanças de seqüência primária de aminoácidos com outras proteínas descritas e cujas seqüências estão disponíveis nos diferentes bancos de dados público, incluindo a do genoma de *Leishmania*. Achados recentes em nosso laboratório, mostraram que LaRbp38 interage com DNA telomérico na forma de dupla fita, simples fita e com kDNA de *L. amazonensis* (Lira et al. 2007c). Sendo assim, e baseado nestes resultados, foram construídos 5 proteínas mutantes a partir de LaRbp38, contendo diferentes regiões da mesma. Comprovamos que a exemplo de LaRPA-1, a LaRbp38 e seus mutantes 1, 2, 3 e 5 só se tornavam solúveis e adquiriam estrutura secundária na presença de heparina. Parece que neste caso também, é que a heparina funciona como uma chaperona auxiliando no enovelamento de proteínas expressas de forma insolúvel (Lira

et al; 2009d) Após enoveladas e na sua forma solúvel, as proteínas citadas acima foram submetidas a ensaios de EMSA e competição usando diferentes sondas (Tel1, kDNA e LaTel). Estes ensaios mostraram a formação de complexos de LaRbp38 e seus mutantes mut2, mut3 e mut5 com as diferentes sondas testadas, além de uma fraca interação do mut1 com kDNA e LaTel. A análise quantitativa desses ensaios mostrou que o domínio de ligação de LaRbp38 aos diferentes DNAs testados, pode ser um tipo de domínio estrutural, onde o *fold* correto de cada mutante pode estar relacionado com a ligação preferencial a diferentes tipos de DNAs, baseado nos resultados em que tanto LaRbp38 quanto seus mutantes 2, 3 e 5 apresentam interação com diferentes tipos de DNAs testados, mas cuja preferência é diferencial para cada mutantes. Segundo King 1993, cada proteína apresenta um enovelamento próprio e este pode estar diretamente ligado ao modo de como essa proteína vai interagir com seu ligante. Resultados obtidos por Zhou et al, 2009 com a proteína Brh2 de mamíferos, mostram que a região N-terminal da proteína contribui substancialmente para função biológica da mesma e abriga domínios de ligação a DNA específicos capazes de reconhecer conformações estruturais na proteína para assim promover transações intermoleculares. Em conjunto, estes resultados sugerem que esse(s) domínio(s), possivelmente se sobrepõe, e está(ão) localizado(s), segundo resultados apresentados nesta tese, na região da proteína sobreposta pelos mutantes 2, 3 e 5, compreendendo resíduos 95 e 283, composto por cerca de 188 aminoácidos. Contudo, parece que os mut2, mut3, mut5, por serem mutantes deletoriais, podem ter perdido parte(s) essencial(is) da proteína tornando impossível o re-enovelamento adequado dos mesmos e por isso o baixo sinal de leitura de CD. Isto pode sugerir que os mutantes 2, 3 e 5 possam apresentar-se como proteínas do tipo IUP, ou seja que apresentam enovelamento parcial de sua estrutura, assim como sugerido por Lira et al; 2009d para a proteína LaRPA.

Alguns trabalhos evidenciaram Rbp38 como uma proteína com função nuclear (Duhagon et.al, 2003 e Fernández et al.2004), porém nenhuma evidência de sua sub-localização nuclear havia sido descrita até então. Nesta tese, apresentamos mais evidências sobre a localização subcelular de LaRbp38 quando mostramos resultados de experimentos de *Western blotting*, usando extratos

celulares fracionados de núcleo, citoplasma e mitocôndria e os mesmos são revelados com soro anti-LaRbp38. Nossos resultados mostram comprovadamente que a proteína pode estar presente nos três compartimentos. Ensaio de imunofluorescência indireta, revelados com o mesmo soro anti-LaRbp38 (Fig. 6), mostraram a proteína LaRbp38 é expressa em poucas células no núcleo de parasitas originados de cultura não sincronizada e que a maior parte da proteína apresenta localização polarizada no cinetoplasto à semelhança dos achados de super-expressão de p38 fusionada com GFP realizados em *T. brucei* por Liu et al. (2006). No caso da p38 de *T. brucei* é possível que a proteína apresente 2 isoformas, uma com função nuclear e outra com função no cinetoplasto, à semelhança da proteína Pif1 que tem função telomérica e mitocondrial em mamíferos e leveduras (Zhang et al; 2006, Futami, et.al 2007). É possível que no caso de *T. brucei*, Liu et.al. (2006) só foram capazes de examinar a expressão da isoforma presente no cinetoplasto. Isto se explicaria pelo fato de que já existem evidências mostrando que outras proteínas em *T. brucei* possuem isoformas com funções em organelas diferentes. Um bom exemplo é a Topoisomerase II, que em *T. brucei* apresenta dois genes codificando duas isoformas, as quais têm funções separadas no núcleo e no cinetoplasto (Kulikowicz & Shapiro, 2006). Já em *Leishmania* e *T. cruzi* a Topoisomerase II é codificada por um único gene (Das et al., 2001, Das et al., 2006). No caso de LaRbp38, especulamos que apenas uma proteína exerça funções diferentes em ambas organelas (mitocôndria/cinetoplasto e núcleo), o que em partes foi comprovado nos ensaios *in vivo* de imunoprecipitação de cromatina por Lira et al (2007c) e por nós, nesta tese. É provável que em *Leishmania* a proteína LaRbp38 tenha capacidade de se translocar pelos diferentes compartimentos celulares durante o ciclo de vida do parasita. De acordo com isso, Lira e Cano (dados não publicados) propuseram anteriormente que a proteína contém, além do sítio de endereçamento mitocondrial na porção N-terminal (MTS - Mitochondrial Targeting Signal), sítios de exportação/importação nuclear, localizados em porções ricas em aminoácidos do tipo L (Leu), (Dubessay et al; 2006), encontrados tanto nas porções N quanto C-terminal da proteína. Mais ainda, a baixa frequência de visualização de LaRbp38 no núcleo, ou sua passagem transiente por esta organela, nos parasitas, poderia ser explicada também pelo fato de que no cinetoplasto a proteína é requerida em abundância durante a replicação de milhares de cópias de DNA de mini-círculo,

enquanto que no núcleo a quantidade de LaRbp38 requerida talvez ocorra em níveis abaixo do detectável pelas técnicas usuais de microscopia de fluorescência. Este fato acontece, por exemplo, com a proteína TzCRK1 de *T. brucei*, onde a proteína aparece em quantidades quase indetectáveis no núcleo, porém se acumula em grande quantidade no cinetoplasto (Gómez et al., 2006).

Desta forma, é de total interesse continuar os estudos para se desvendar as possíveis funções de LaRbp38 nas duas organelas. Ensaio de imunoprecipitação usando extratos nucleares, revelaram por *Western blotting* a possibilidade da LaRbp38 formar complexos ou fazer parte de um mesmo complexo no núcleo dos parasitas, com outras proteínas teloméricas tais como LaRpa-1 e LaTRF. Porém, quando esses mesmos eluatos foram submetidos ao seqüenciamento por espectrometria de massa, peptídeos das proteínas LaRpa-1 e LaTRF não foram identificados na mistura, o que pode ter sido devido a pouca abundância dessas proteínas nos extratos nucleares. Em contraposição, identificou-se a presença de várias proteínas que cumprem função em maquinaria de replicação de DNA e de transporte intracelular de proteínas tais como ribonucleases, ATPase, helicases, ligases e chaperonas, respectivamente, o que de certa forma confirmam uma das possíveis funções de LaRbp38 e seu transito intracelular. Porém, esses resultados são muito preliminares, tendo que ser repetidos e aprofundados para obtenção de conclusões mais precisas.

Mais estudos serão necessários para avaliar como os resultados obtidos neste trabalho são relevantes para a função da proteína *in vivo*, mas estes dados são uma primeira indicação de que lições aprendidas a partir de estudos com organismos modelo podem fornecer paradigmas para determinar as funções celulares de LaRbp38 em *Leishmania*. Outras características e propriedades bioquímicas da LaRbp38 serão, sem dúvida, altamente informativas, até mesmo porque esta proteína está na lista do banco de dados da Organização Mundial de Saúde (http://tdrtargets.org/targets/view?gene_name=LmjF23.0760), que classifica a mesma como um alvo importante (TDR Targets ID: 24086) para desenvolvimento de drogas e terapias contra doenças tropicais negligenciadas.

6. Conclusões

- LaRbp38, apresenta domínio(s) de ligação a diferentes DNAs. Este ainda não havia sido descrito e parece estar localizado na porção mediana da proteína (entre os aminoácidos 95 e 283) que compreende os mutantes 2,3 e 5, podendo o mesmo ser estendido em direção ao N-terminal da proteína.
- LaRbp38 e seus mutantes 2, 3 e 5 apresentam afinidades diferentes aos DNAs testados (Tel1, Latel, kDNA e NonTel), o que pode sugerir a existência de mais de um domínio do tipo estrutural, de interação aos diferentes DNAs, os quais podem estar sobrepostos.
- LaRbp38 é uma proteína que provavelmente transita entre dois ou mais compartimentos celulares, a saber: núcleo, citoplasma e cinetoplasto/mitocôndria. Sua passagem transiente pelo núcleo dificulta sua visualização por imunofluorescência indireta, porém a proteína é abundantemente visualizada de forma polarizada no cinetoplasto. Isto sugere que ela tem funções diferenciadas na célula e que ela deve ser recrutada de forma diferente para ambas organelas.
- Extratos nucleares de *L.amazonensis*, imunoprecipitados com soro anti-LaRbp38 e com soros anti-LaRpa-1 e anti-LaTRF, demonstraram a possível interação da mesma, a proteínas teloméricas (LaRPA e TRF). A análise por espectrometria de massa de peptídeos trípticos originados da imunoprecipitação com anti-LaRbp38, sugerem a interação de LaRbp38 com proteínas da maquinaria de replicação e transporte intracelular, tais como: helicases, ATPases, Ribonucleases, e chaperonas, por exemplo. Estas evidências podem sugerir uma possível função de LaRbp38 na maquinaria de replicação do DNA.

7. Produções bibliográficas complementares

Artigo I: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2007), doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.144

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

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

ABSTRACT

Replication protein A (RPA) is a highly conserved single-stranded DNA-binding protein involved in DNA replication, recombination, repair and telomere maintenance. In yeast, RPA-1 works as a telomerase recruiter and in humans, it is able to unfold G-quartet structures formed by the 3'G-rich telomeric strand. Using biochemical approaches we were able to identify RPA-1 as a *Leishmania amazonensis* G-strand telomere binding protein (LaRPA-1). In trypanosomatids, which includes *Leishmania*, Rpa-1 lacks the N-terminal OB-fold RPA70N but have a conserved canonical OB fold and a truncated RFA-1 structural domain. Recombinant LaRPA-1 and a deletion mutant containing the OB fold DNA binding domain interact with the G-rich telomeric DNA. In contrast, binding was abolished when assays were done with a mutant bearing only the C-terminal half, suggesting that similarly to other single-stranded telomere binding protein, the OB fold domain is necessary for protein-DNA association. An immunoprecipitation assay using anti-LaRPA-1 antibody showed that the telomeric sequence co-immunoprecipitated with LaRPA-1, which strongly indicates that LaRPA-1 binds telomere *in vivo*. The nuclear localization of LaRPA-1 by immunofluorescence confirms that LaRPA-1 is a *Leishmania* nuclear protein. The importance of LaRPA-1 at *Leishmania* telomeres is discussed.

Artgo II. Biochim Biophys Acta. 2008 Nov 12.

DNA and heparin chaperone the refolding of purified recombinant replication protein A subunit 1 from *Leishmania amazonensis*.

Lira CB, Gui KE, **Perez AM**, da Silveira RC, Gava LM, Ramos CH, Cano MI

Department of Genetics, Biosciences Institute, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, SP, 18618000 Brazil.

Abstract

Replication protein A (RPA) is a single-stranded DNA-binding protein that has been implicated in DNA metabolism and telomere maintenance. Subunit 1 of RPA from *Leishmania amazonensis* (LaRPA-1) has previously been affinity-purified on a column containing a G-rich telomeric DNA. LaRPA-1 binds and co-localizes with parasite telomeres in vivo. Here we describe the purification and characterization of native recombinant LaRPA-1 (rLaRPA-1). The protein was initially re-solubilized from inclusion bodies by using urea. After dialysis, rLaRPA-1 was soluble but contaminated with DNA, which was removed by an anion-exchange chromatography of the protein solubilized in urea. However, rLaRPA-1 precipitated after dialysis to remove urea. To investigate whether the contaminating DNA was involved in chaperoning the refolding of rLaRPA-1, salmon sperm DNA or heparin was added to the solution before dialysis. The addition of either of these substances prevented the precipitation of rLaRPA-1. The resulting rLaRPA-1 was soluble, correctly folded, and able to bind telomeric DNA. This is the first report showing the characterization of rLaRPA1 and of the importance of additives in chaperoning the refolding of this protein. The availability of rLaRPA-1 should be helpful in assessing the importance of this protein as a potential drug target

8. Referências Bibliográficas

- Aubert, G. and Lansdorp, P.M.** (2008) Telomeres and Aging *Physiol. Rev.* 88, 557-579.
- Baumann, P. and Cech, T.R.** (2001). Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* 292, 1171–1175
- Bianchi, A., Smith, S., Chong, L., Elias, P., de Lange, T.** (1997) TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J.* 16, 1785-1794.
- Bianchi A, Shore D.** (2007) Early replication of short telomeres in budding yeast. *cell.*128:1051-62.
- Blackburn, E.H.** (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 106: 661-673.
- Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L., de Lange, T.** (1997) Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nature Gen.* 17: 231-235.
- Cano, MIN, Dungan J, Agabian N, Blackburn EH.** Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. (1999) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96, 3616-3621.
- Cano, M.I.N.** (2001) Telomere biology of trypanosomatids: More question than answers. *Trends Parasitol.*, 17, 425-429.
- Chance ML, Peters W, Shchory L.** (1974) Biochemical taxonomy of *Leishmania*. I. Observations on DNA. *Ann Trop Med Parasitol.* 68:307-16.
- Chandra, A., Hughes, T.R., Nugent, C.I., Lundblad, V.** (2001) Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev.* 15, 404-414.
- Cohn, M., Blackburn, E.H. (1995).** Telomerase in yeast. *Science*, 269: 396–400.
- Conte, F.F. and Cano M.I.N** (2005). Genomic organization of telomeric and subtelomeric sequences of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Int. J. Parasitol.*
- 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.
- Degrave, W., Fernandes, O., Campbell, D., Bozza, M., Lopes, U.,** 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review., Rio de Janeiro, vol. 89(3): 463-469

de lange, T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*, 21: 532-540.

de Lange, T. (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Dev.* 19:2100–2110.

Duhagon, M. A., Dallagiovanna, B., Ciganda, M., Ruyechan, W., Williams, N., Garat, B. (2003) A novel type of single-stranded nucleic acid binding protein recognizing a highly frequent motif in the intergenic regions of *Trypanosoma cruzi*. *Bioch and Bioph Res Com*, 309: 183-188.

Evans, S. e Lundblad, V. (1999) Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* 286, 117-120.

Evans S.K. e Lundblad V.J. (2000) Positive and negative regulation of telomerase access to the telomere. *J. Cell Sci.* 19, 3357-3364.

Fernandez, M.F., Castellar, 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(14):3050-63.

Funasa, 2002 –Vigilância epidemiológica. <http://www.funasa.br>

Futami, K*; Shimamoto, A ; Furuichi, Y. (2007). Mitochondrial and Nuclear Localization of Human Pif1 Helicase. *Biol. Pharm. Bull.* 30(9) 1685—1692.

Giardini, M.A., Lira, C.B.B., Conte, F.F., Camillo, L.R., Siqueira Neto, J.L., Ramos, C.H.I. e CANO, M.I.N. (2006) The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: gene cloning and characterization. *Parasitol. Res.* 14:1-8.

Gilson, E. and Gelli, V. (2007) How telomeres are replicated. *Nature Rev. Mol Cell Biol.* 8, 825-838.

Greider, C.W., Blackburn, E.H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, 337: 331-337.

Harrington, L. (2005). Making the most of a little: dosage effects in eukaryotic telomere length maintenance. *Chromosome Res*, 13:493-504

Henderson, E. & Blackburn, E. (1993). An overhang 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol. Cell Biol.* 9: 345-348.

Johnston, D., Blaxter, M., Degrave, W., Foster, J., Ivens, A., Melville, S. (1999). Genomics and the biology of parasites. *BioEssays*, 21:131-147.

Jonsson, F., Postberg, J., Schaffitzel, C., Lipps, H. J. (2002) Organization of the macronuclear gene-sized pieces of stichotrichous ciliates into a higher order structure via telomere-matrix interactions. *Chromosome Res.* 10(6):445-53.

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

Kim, N.W., Piatyszczek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D. et al. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 266: 2011–2015.

King, J, 1993. A very short review of protein folding, *The Unfolding Puzzle of Protein Folding*, Technology Review, 58-61

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.* 23, 357-362

Lira, C. B. B., Siqueira Neto, J.L., Khater, L., Cagliari, T., Peroni, L., Reis, J. R., Ramos, C., Cano, M. I. N. (2007b) LaTBP1: a *Leishmania amazonensis* DNA-binding protein that associates *in vivo* with telomeres and GT-rich DNA using a myb-like domain. *Arch. Biochem. Biophys.*, 465, 399-409.

Lira, C.B.B., Siqueira Neto, J.L., Giardini, M.A., Winck, F.V., Ramos, C.H.I., Cano, M.I.N. (2007c) LaRbp38: a *Leishmania amazonensis* protein that binds nuclear and kinetoplast DNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2007), doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.005

Lira, C.B.B, Gui,k.E., Perez, A.M., Silveira,R.C.V, Ramos,C,H,I, Cano,M,I,N. (2009d) DNA and heparin chaperone the refolding of purified recombinant Replication Protein A subunit 1 from *Leishmania amazonensis*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, volume 1790, issue 2 , pages 119 - 125

Li, B. Oestreich, S., de Lange, T. (2000) Identification of Human Rap1:Implications for Telomere Evolution. *Cell* 101: 471-483.

Li, B., Espinal, A. and Cross, G.A.M. (2005) *Trypanosome* telomeres are protected by a homologue of mammalian TRF2. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5011–5021.

Liu, B, Molina, H, Kalume, D, Pandey, A, . Griffith, J,D & Englund, P,T; Role of p38 in Replication of *Trypanosoma brucei* Kinetoplast DNA, *Molecular and Cellular Biology*, July 2006, p. 5382–5393.

Lucca, R.S; Hansen, O; Oliva, M.L.V. (2005). Artigos & Ensaios. *Revista Varia Scientia* v. 05, n. 10, p. 97-112.

Magenat, L., Tobler, H., Muller, F. (1999). Developmentally regulated telomerase activity is correlated with chromosomal healing during chromatin diminution in *Ascaris suum*. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 3457–3465.

Mair, G.; Shi, H.; Li, H.; Djikeng, A.; Aviles, H.O.; Bishop, J.R.; Falcone, F.H.; Gavrilescu,C.; Montgomery, J.L.; Santori, M.I.; Stern, L.S.; Wang, Z.; Ullu, E.; Tschudi, C. (2000) A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-*splicing* of pre-mRNA. *RNA*, v. 6, n. 2, 163-169.

Makarov, V.L., Lejnine, S., Bedoyan, J., Langmore, J.P. (1993). Nucleosomal organization of telomere-specific chromatin in rat. *Cell*, 73: 775-787.

McKnight, T.D., Fitzgerald, M.S., Shippen, D.E. (1997). Plant telomeres and telomerases. A review. *Biochemistry (Mosc.)*, 62: 1224–1231.

Mitton-Fry, R.M., E.M. Anderson, T.R. Hughes, V. Lundblad and D. Wuttke, D.S. 2002. Conserved structure for single-stranded telomeric DNA recognition. *Science* 296: 145–147.

Morin, G.B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*, 59: 521–529.

Muñoz, D.P., Collins, K. (2004). Biochemical properties of *Trypanosoma cruzi* telomerase. *Nucleic Acids Res.*, 32: 5214-5222.

Munoz-Jordan, J.L., Cross, G.A., De Lange, T., Griffith, J.D. (2001) T-loops at trypanosome telomeres. *EMBO J.* 20, 579-588.

Myler PJ, Sisk E, Mcdonagh PD, Martinez-Calvillo S, Schnauffer A, Sunkin SM, Yan S, Madhubala R, Ivens A, Stuart K. (2000) Genomic organization and gene function in Leishmania. *Biochem Soc Trans.*28:527-31.

Neves, D.P., Melo, A.L., Genaro, O. e Linardi, P.M. (2000). Parasitologia Humana. 10a Edição, Ed. Atheneu, pp. 31-72.

Nugent, Cl, Hughes, TR, Lue, NF and Lundblad, V. (1996) Cdc13p: A single strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* 274,249–252.

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

Price, C.M., CECH, T.R. (1987) Telomeric DNA-protein interactions of Oxytricha macronuclear DNA *Genes Dev.* 1, 783-793.

Rey, L. Parasitologia. Editora Guanaba Koogan, Rio de Janeiro, 2001.

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 Research*, 34:4857–4865.

Sasaki, T., Fujiwara, H. (2000). Detection and distribution patterns of telomerase activity in insects. *Eur. J. Biochem.*, 267: 3025–3031.

Sbicego, S., ALfonzo, J.D., Estevez, A.M., Rubio, M.A., Kang, X., Turck, C.W., Peris, M., Simpson, L., 1987. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annual Review in Microbiology*, 41:363-82.

Schramke, V., Luciano, P., Brevet, V., Guillot, S., Corda, Y., longhese, M. P., Gilson, E. , Geli, V. (2004). RPA regulates telomerase action by providing est1p access to chromosome ends. *Nature Genetics*, 36: 46-54.

Simpson, L. (2003) RBP38, a Novel RNA-Binding Protein from Trypanosomatid Mitochondria, Modulates RNA Stability. *Eukaryot. Cell.* 2, 560-568.

Smith, J., Zou, H., Rothstein, R. (2000) Characterization of genetic interactions with RFA1: the role of RPA in DNA replication and telomere maintenance. *Biochimie* 82, 71-78.

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

Smith, J., Zou, H., Rothstein, R. (2000) Characterization of genetic interactions with RFA1, the role of RPA in DNA replication and telomere maintenance. *Biochimie* 82, 71-78.

Smogorzewska, A. e De Lange, T. (2004) Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 177–208.

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.

Taggart, A.K., Teng, S.C., and Zakian, V.A. (2002) Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science* 297, 1023–1026.

Takata, H., Tanaka, Y. and Matsuura, A. (2005) Late S phase specific recruitment of Mre11 complex triggers hierarchical assembly of telomere replication proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* 17, 573–583.

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.

Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY, Taylor SS: Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* 1995, 82:463-473

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.* 1997 Nov 1;11(21):2801-9.

Xin H, Liu D, Wan M, Safari A, Kim H, Sun W, O'Connor MS, Songyang Z. (2007) TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature*, 445:559-62.

Yang, Q., Zheng, Y.L., Harris, C.C. POT1 and TRF2 (2005) Cooperate to maintain Telomeric Integrity *Molecular and Cellular Biology* 25(3): 1070-1080

Ye, J.Z., Donigian, J.R., Van Overbeek, M., Loayza, D., Luo, Y., Krutchinsky, A.N., Chait, B.T., and De Lange, T. (2004) TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres *J. Biol. Chem.* 279: 47264–47271.

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.

Zaug, A.J., Podell, E.R., Cech, T.R. (2005) Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:10864–10869.

Zhang, D.H; Zhou, B; Huang, Y; Xu, L.X; Zhou, L.Q. The human Pif1 helicase, a potential *Escherichia coli* RecD homologue, inhibits telomerase activity.(2006). *Nucleic Acids Research*.

Zhou, Q; Kojic, M; and William K. Holloman¹ (2009). DNA-binding domain within Brh2 N-terminus is the primary interaction site for association with DNA, *The journal of Biological Chemistry*, in press.