

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES *IN VIVO* ENTRE AS PROTEÍNAS  
TELOMÉRICAS LaRPA-1 E LaRbp38 USANDO O SISTEMA DO DUPLO  
HÍBRIDO**

**Douglas Diez Gonçalves**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

**BOTUCATU – SP**

**2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES *IN VIVO* ENTRE AS PROTEÍNAS  
TELOMÉRICAS LaRPA-1 E LaRbp38 USANDO O SISTEMA DO  
DUPLO HÍBRIDO**

**Douglas Diez Gonçalves**

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Nogueira Cano

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado à Universidade Estadual  
Paulista "Júlio de Mesquita Filho",  
Instituto de Biociências, Campus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biomédicas.

**BOTUCATU – SP**

**2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Gonçalves, Douglas Diez.

Estudo das interações *in vivo* entre as proteínas teloméricas LaRPA-1 e LaRbp38 usando o sistema do duplo híbrido / Douglas Diez Gonçalves.  
- Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Maria Isabel Nogueira Cano  
Capes: 20202008

1. Leishmaniose. 2. Proteínas - Análise. 3. Genética – Expressão.

Palavras-chave: Duplo híbrido; LaRPA-1; LaRbp38; *Leishmania amazonensis*;  
Leishmaniose; Telômeros.

## **Agradecimentos**

A Deus, por estar presente em todos os momentos iluminando minha jornada pela graduação.

Aos meus pais, por tudo que me ensinaram durante meu desenvolvimento para que eu pudesse chegar até aqui, pelo incentivo, pela compreensão, por todo o esforço, por nunca deixar nada me faltar, e principalmente pelo grande amor deles que sempre me fortalece.

A minha orientadora, Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano, por todo conhecimento provido, por toda a paciência, preocupação, suporte, companheirismo, determinação, e principalmente por ensinar os princípios e a essência da ciência.

Ao Prof. Dr. Eduardo Bagagli, muito humilde e cordial, sempre disposto a ajudar, que gentilmente me cedeu espaço em seu laboratório para que eu pudesse realizar boa parte de meu projeto com leveduras.

Ao Prof. Dr. Jörg Kobarg do LNBio - CNPEM, que foi muito atencioso e gentil em ceder seu espaço para que sua aluna Edmárcia pudesse me ensinar alguns princípios e técnicas do duplo híbrido.

Aos meus companheiros de laboratório, Arina, Bárbara, João, Jomar, Marcelo, Paulo, Rafael, Rita e Vinícius que são pessoas muito esforçadas e empenhadas no que fazem, sempre muito atenciosos, com muita boa vontade para me ensinar e auxiliar nas dificuldades e experimentos. Agradeço também pelas amizades e as boas conversas, que tornaram o ambiente de trabalho um local muito confortável e de um grande aprendizado

para vida toda. Cada um foi muito especial de maneiras distintas em minha formação como biomédico e pessoa.

Aos meus companheiros do laboratório do Prof. Dr. Eduardo Bagagli, Assis, Gabriel, Juliana, Mariana, Raquel, Tâmara e Thales, os quais nunca me negaram nada e sempre me ajudaram quando precisei com uma dedicação admirável. Agradeço também pelos bons momentos que tive e pelas amizades.

Ao Departamento de Genética e seus funcionários, sempre muito atenciosos e dispostos a ajudar, oferecendo todos recursos para que pudesse trabalhar.

A FAPESP pela confiança e apoio financeiro de meu projeto.

A minha turma de Ciências Biomédicas XLV, meus colegas de sala de aula, onde conheci pessoas incríveis, onde tive muitos momentos felizes e aos amigos que levarei para vida toda.

# SUMÁRIO

## Lista de figuras

## Resumo

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Introdução</b> .....   | 9  |
| 1.1. <i>Leishmania</i> spp. e Leishmaniose .....   | 9  |
| 1.2. Biologia molecular de protozoários do gênero <i>Leishmania</i> .....                                    | 11 |
| 1.3. Características dos telômeros de <i>Leishmania</i> spp. ....  | 12 |
| 1.4. Complexo telomérico em <i>Leishmania amazonensis</i> .....  | 13 |
| 1.5. Funções da proteína RPA nos telômeros .....   | 14 |
| 1.6. Funções da proteína Rbp38 nos telômeros .....   | 17 |
| 1.7. O sistema duplo híbrido como ferramenta para estudar<br>interações <i>in vivo</i> entre proteínas ..... | 17 |
| <b>2. Hipótese a ser testada e racional do projeto</b> .....   | 19 |
| <b>3. Objetivo</b> .....   | 23 |
| Objetivos específicos .....  | 23 |
| <b>4. Metodologia</b> .....  | 23 |
| 4.1. Subclonagem do gene <i>LaRPA-1</i> no vetor<br>pGAD424 (domínio de ativação) .....                      | 23 |
| 4.2. Subclonagem do gene <i>LaRbp38</i> no vetor pBTMK<br>(domínio de interação com DNA) .....               | 24 |
| 4.3. Transformação de leveduras da linhagem L40 .....  | 24 |
| 4.4. Teste de auto-ativação da transcrição do gene repórter <i>HIS3</i> .....                                | 25 |
| 4.5. Teste de expressão do gene repórter de $\beta$ -galactosidade<br>na presença de X-gal .....             | 25 |

|  |    |
|--|----|
| <b>5. Resultados e Discussão</b> .....   | 26 |
| 5.1. Obtenção de DNA plasmidial do gene LaRPA-1<br>clonados no vetor pGAD424 .....   | 26 |
| 5.2. Subclonagem do gene LaRbp38 no vetor pBTMK .....  | 27 |
| 5.3. Transformações dos vetores vazios em leveduras L40 .....  | 27 |
| 5.4. Transformação da leveduras L40 em triplicata com os plasmídeos<br>pGAD-RPA, pGAD vazio, pBTMK-Rbp38 e pBTMK vazio .....                         | 28 |
| 5.5. Teste de autoativação em triplicata das construções LaRPA-1-AD<br>e LaRbp38-BD e dos vetores vazios pGAD e pBTMK .....                          | 30 |
| 5.6. Construção dos híbridos pBTMK/pGAD, pBTMK-Rbp38/pGAD-RPA,<br>pBTMK/pGAD-RPA e pGAD/pBTMK-Rbp38 e<br>do controle positivo pBTMK(+)/pACT(+) ..... | 31 |
| 5.7. Teste de autoativação dos co-transformantes .....   | 33 |
| 5.8. Teste de inibição competitiva de <i>HIS3</i> utilizando a droga 3-AT .....  | 34 |
| 5.9. Teste de expressão do gene repórter de $\beta$ -gal na presença de X-gal .....  | 35 |
| <b>6. Considerações Finais</b> .....   | 37 |
| <b>Abstract</b> .....  | 38 |
| <b>Referências Bibliográficas</b> .....  | 40 |

## Lista de figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1- Representação esquemática dos telômeros de Leishmania .....   | 14 |
| Figura 2- Representação esquemática mostrando como ocorre a ativação<br>de transcrição do promotor do gene repórter .....     | 18 |
| Figura 3- Mapa e sítio de policlonagem dos vetores pGAD424 .....  | 20 |
| Figura 4- Mapa e sítio de policlonagem do vetor pBTMK .....   | 21 |
| Figura 5- Representação esquemática da possível interação<br>entre as proteínas Rbp38 e RPA-1 .....                           | 22 |
| Figura 6- Confirmação da clonagem do gene LaRPA-1<br>no vetor pGAD424 .....   | 26 |
| Figura 7- Gel de agarose mostrando a presença do<br>inserto Rbp38 no vetor pBTMK .....  | 27 |
| Figura 8- Transformações dos vetores vazios<br>(pGAD424 e pBTMK) em leveduras L40 .....                                       | 28 |
| Figura 9- Teste de transformação dos recombinantes pGAD-RPA (LaRPA-1-AD) e<br>pBTMK-Rbp38 (LaRbp38-BD) em leveduras L40 ..... | 29 |
| Figura 10- Os recombinantes LaRPA-1-AD e LaRbp38-BD não<br>autoativam o promotor de <i>HIS3</i> .....                         | 30 |
| Figura 11- Crescimento dos co-transformantes<br>em meio mínimo SD-Leu-Trip .....  | 32 |
| Figura 12- Teste de ativação do promotor de <i>HIS3</i> .....   | 33 |
| Figura 13- Teste dos co-transformantes em meio SD-Leu-Trip-His<br>contendo competidor de His3, a droga 3-AT .....             | 34 |
| Figura 14- Teste de interação proteína:proteína pela expressão de $\beta$ -gal .....  | 36 |

## Resumo

A leishmaniose é um conjunto de doenças infecciosas causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, que afligem milhões de pessoas no mundo, tendo a cada ano dois milhões de novos casos e 70 mil mortes. As drogas utilizadas no tratamento das diferentes formas clínicas da doença apresentam alta toxicidade e baixa eficácia, além de apresentarem muitos efeitos colaterais e colaborarem com o aparecimento de parasitas e vetores resistentes. Devido a estas adversidades, o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento desta parasitose é incentivada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e um maior conhecimento sobre a biologia molecular destes protozoários poderá facilitar estas descobertas. Ultimamente, os telômeros, estruturas nucleoproteicas nos terminais dos cromossomos de eucariotos, têm sido alvo intenso de estudos, que visam utilizá-los como alvo terapêutico contra tumores malignos e microrganismos patogênicos. Os telômeros geralmente se apresentam como estruturas dinâmicas onde ocorrem interações entre o DNA e proteínas, resultando na formação do complexo telomérico, que é responsável pela proteção e manutenção dos cromossomos e estabilidade do genoma, caracterizando uma função imprescindível para viabilidade celular. Componentes do complexo telomérico de *Leishmania amazonensis* foram identificados por ensaios bioquímicos em extratos positivos para a atividade de telomerase. Entre estes componentes identificou-se as proteínas LaRPA-1 (*L. amazonensis* Replication Protein A-1) e a LaRbp38 (*L. amazonensis* RNA binding protein) as quais mostraram habilidade de interagir com o DNA telomérico *in vitro* e *in vivo*. Mais recentemente, utilizando-se ensaios de imunoprecipitação e de captura por “pull-down” foi demonstrado que estas proteínas fazem parte de um mesmo complexo nos telômeros do parasita.

Este trabalho pretende confirmar estas possíveis interações entre as proteínas teloméricas LaRPA-1 e LaRbp38 de *Leishmania amazonensis*, utilizando o sistema de análise *in vivo* conhecido como duplo híbrido. O intuito é padronizar essa metodologia em nosso laboratório, pois ela permite verificar interações proteína:proteína utilizando um método simples de análise da expressão de genes repórter permitindo a compreensão destas interações.

Após a obtenção e purificação dos plasmídeos pGAD-RPA e pBTMK-Rbp38, foram realizadas as transformações individuais com os plasmídeos pGAD, pGAD-RPA, pBTMK e pBTMK-Rbp38 para analisar o correto crescimento das leveduras nos meios mínimos e para fazer o teste de autoativação do promotor do gene repórter de *HIS3* dos transformados. Posteriormente foram realizadas as co-transformações pGAD/pBTMK, pGAD-RPA/pBTMK, pGAD/pBTMK-Rbp38 (controles negativos), pACT(+)/pBTMK(+) (controle positivo) e pGAD-RPA/pBTMK-Rbp38, alvo do estudo. Com estes co-transformantes foram realizados os

testes de autoativação do promotor do gene repórter de *HIS3*, o teste com a droga 3-AT, inibidor competitivo do produto da expressão do gene *HIS3*, para analisar o grau da possível interação e o teste de expressão do gene repórter de  $\beta$ -gal na presença de X-gal para confirmar os resultados.

Os resultados obtidos neste estudo, mostram que ocorre a autoativação do promotor do gene repórter de *HIS3* por um dos controles negativos (pBTMK/pGAD-RPA) e também uma inexpressiva interação entre as proteínas LaRPA-1 e LaRbp38 usando a construção pGAD-RPA/pBTMK-Rbp38. A literatura prediz que esta metodologia é passível da ocorrência de alguns problemas, inclusive que algumas proteínas não podem ter suas interações estudadas pelo sistema do duplo híbrido. Segundo relatado pelo manual da Clontech, estes resultados de difícil interpretação podem ter causa específica entre elas: a instabilidade de uma ou ambas as proteínas quando expressas a partir dos vetores recombinantes, ou enovelamento incorreto da(s) proteína(s) recombinante(s) provocando a oclusão do domínio de interação desta(s) ao promotor, ou a incorreta localização subcelular da(s) proteína(s) recombinante(s), não permitindo seu encaminhamento ao interior do núcleo devido a sua conformação. Frente a estes problemas, estamos construindo outros recombinantes invertendo a isca, ou seja, a LaRPA-1 passaria a estar fusionada no domínio de ligação ao DNA (LaRPA-1-BD) e LaRbp38 passaria a estar fusionada com o domínio de ativação (LaRbp38-AD) numa tentativa de contornar estes problemas.

Foi possível concluir que apesar de não terem sido obtidos resultados muito conclusivos em relação a interação entre LaRPA-1 e LaRbp38, o sistema do duplo híbrido foi implementado em nosso laboratório, com sucesso, haja vista que a obtenção e análise dos co-transformantes foi bastante reprodutível, abrindo assim portas para novos estudos de interação proteína:proteína através deste sistema *in vivo*.

**Palavras Chave:** Leishmaniose, *Leishmania amazonensis*, telômeros, LaRPA-1, LaRbp38, duplo híbrido.

## 1. Introdução

### 1.1. *Leishmania* spp. e Leishmaniose

A *Leishmania* spp. é um parasita pertencente à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, gênero *Leishmania*, sendo responsável por causar a leishmaniose, conhecida como um conjunto heterogêneo de doenças infecciosas não contagiosas. Os protozoários deste grupo são caracterizados pela presença de uma única mitocôndria denominada cinetoplasto, uma organela fusiforme rica em DNA mitocondrial (kDNA) organizado na forma de maxicírculos e minicírculos (SIMPSON, 1987).

O ciclo de vida digenético deste parasita é caracterizado pela alternância entre a forma amastigota intracelular aflagelada, que vive no hospedeiro mamífero e a forma promastigota extracelular flagelada, que vive no tubo digestivo do inseto vetor, insetos hematófagos pertencentes à família Psychodidae (gênero *Lutzomyia*). Roedores, canídeos, procionídeos, tamanduás, marsupiais, ungulados e primatas (inclusive o homem), servem de reservatório para o parasita, que se reproduz por divisão binária (NEVES et al., 2000; REY, 2002).

A transmissão para os hospedeiros vertebrados ocorre através da picada do inseto infectado, no momento da hematofagia, introduzindo as formas infectivas, ou promastigotas metacíclicas, no hospedeiro mamífero, que são fagocitadas por macrófagos superficiais e no seu interior transformam-se em amastigotas. Estas amastigotas dividem-se causando a eventual lise do macrófago e neste instante, muitas amastigotas caem na corrente sanguínea e são novamente fagocitadas por novas células do sistema monocítico fagocitário do hospedeiro (NEVES et al. 2000; REY, 2001).

A doença apresenta-se sob quatro formas clínicas em humanos, dependendo da espécie parasitaria e do sistema imunológico do infectado: (1) leishmaniose cutânea que culmina exclusivamente em lesões cutâneas, ulcerosas ou não, porém restritas. (2) leishmaniose mucocutânea ou cutâneo-mucosa que caracteriza formas que resultam frequentemente no aparecimento de lesões destrutivas nas mucosas do nariz, boca e

faringe. (3) leishmaniose cutânea difusa com formas disseminadas cutâneas que acometem indivíduos anérgicos ou, posteriormente, pacientes que haviam sido tratados de calazar. (4) leishmaniose visceral ou calazar com formas viscerais em que os parasitas têm maior tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM) do baço, do fígado e da medula óssea e dos tecidos linfóides (REY, 2002).

Presente em todos os continentes, exceto na Antártica e na Oceania, a leishmaniose é comum em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Estimativas apontam que há 350 milhões de indivíduos em risco, e que a doença aflige 12 milhões de pessoas. Os dois milhões de novos casos e as 70 mil mortes por ano mostram a importância epidemiológica dessa zoonose. A íntima relação entre esta parasitose e os fatores sócio-econômicos dessas regiões é evidenciada pelo elevado número de países em desenvolvimento que são endêmicos para esta zoonose (72 dos 86). A leishmaniose vem se espalhando, desde 1980, por todas as regiões do Brasil, predominando nas regiões norte e nordeste. Políticas inadequadas de saúde e saneamento básico, além de uma urbanização descontrolada são fatores que facilitam o contato humano com os diferentes tipos de inseto-vetor (FUNASA, 2000; WHO, 1990; GENARO et al., 1990; ARIAS et al., 1996).

Apresentado pela primeira vez em 1985, a co-infecção com o vírus HIV é outro ponto importante dessa zoonose. Com a evolução da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), a leishmaniose recebe novos olhares devido à grande sobreposição epidemiológica das duas doenças. A co-infecção com o vírus HIV, que geralmente ocorre através do compartilhamento de agulhas infectadas, reduz a resposta a terapias e eleva as probabilidades de relapso e de progresso para a forma visceral. Simultaneamente, a leishmaniose acelera o progresso clínico do HIV já que ambas as doenças acometem as células do sistema imunológico (WHO, 2000).

As medidas profiláticas que são aplicadas para reduzir a transmissão, para o controle dos vetores e o tratamento farmacológico da infecção induziram o surgimento de parasitas e vetores resistentes (JOHNSTON et al., 1999).

As principais drogas utilizadas no tratamento da leishmaniose continuam sendo os compostos antimoniais pentavalentes (utilizados desde a década de 1940) e, mais recentemente, as diferentes formulações da anfotericina B. Tais drogas são consideradas eficazes, todavia, possuem desvantagens como: elevada toxicidade, terapias prolongadas, alto custo (no caso da anfotericina B), administração parenteral e eficácia reduzida em algumas situações. Outro quesito importante é o surgimento de parasitas resistentes às essas drogas (JOHNSTON et al., 1999). Por estes motivos, a OMS tem incentivado o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento desta parasitose (KEDZIERSKI et al., 2006). Um maior entendimento, portanto, da biologia celular e molecular desses parasitas é um passo inicial no desenvolvimento de vacinas e drogas parasita-específicas eficazes para a erradicação da doença.

## **1.2. Biologia molecular de protozoários do gênero *Leishmania***

Os protozoários do gênero *Leishmania* são organismos diplóides, assexuados, do qual o genoma está organizado em áreas centrais bem conservadas, com polimorfismos concentrados nas extremidades dos cromossomos (STILES et al., 1999). Possuem um genoma diferenciado quando comparado aos eucariotos típicos, sendo composto de aproximadamente 70 Mb organizados em 34 a 36 cromossomos lineares que variam de tamanho entre 0,35 e 3,0 Mb. Os parasitas não apresentam ciclo sexuado de vida e a condensação cromossômica durante o ciclo mitótico não é observável, complicando assim as análises citogenéticas (WINCKER et al., 1996; JOHNSTON et al., 1999; IVENS et al., 2005).

Os genomas das espécies do gênero *Leishmania* são muito semelhantes entre si, seus genes não detêm íntrons e são transcritos em grupos gerando RNAs precursores policistrônicos, fenômeno comum em protozoários Kinetoplastida. O processamento envolve o acréscimo, por *trans-splicing*, de miniéxons com CAP 7 – Metilguanossina na extremidade 5' de RNAs em maturação e adição de cauda poli-A, gerando assim mRNAs maduros.

Devido à inexistência de promotores gênicos individuais típicos, estima-se que a regulação gênica em *Leishmania* ocorra principalmente em nível pós-transcricional (STILES et al., 1999).

Espécies do gênero *Leishmania* também podem apresentar material genético adicional em mini-cromossomos multicópias ou DNA circular, que podem surgir espontaneamente ou em consequência de exposição a condições adversas tais como pressão por drogas ou tentativa de *knock-out* de um gene essencial para o organismo (BEVERLEY, 1991, SEGOVIA, 1994).

Os genomas de diferentes espécies de *Leishmania* (*L. infantum*, *L. brasiliensis* e *L. major*) foram sequenciados e concluiu-se que poucos genes são importantes para determinar qual a forma clínica da leishmaniose será desenvolvida após a infecção, uma vez que os genomas são muito semelhantes (PEACOCK et al. 2007).

### **1.3. Características dos telômeros de *Leishmania* spp.**

Localizados nas extremidades dos cromossomos eucarióticos, os telômeros são complexos de proteína-DNA, que consistem em sequências repetidas em *tandem* do tipo 5'-TTAGGG-3' finalizando em uma protrusão 3' simples fita denominada 3' *G-overhang*. Estas estruturas são responsáveis pela proteção destes terminais contra degradação, recombinação e fusão com outros cromossomos, além de serem responsáveis pela regulação e estabilidade do tamanho do DNA telomérico. Essa estrutura é essencial para a replicação completa do DNA telomérico durante a divisão celular e está associada a vários processos importantes como controle do número de divisões celulares, envelhecimento celular, regulação da transcrição de genes adjacentes e manutenção da integridade genômica e da arquitetura nuclear (CHAN & BLACKBURN, 2004; DMITRIEV et al., 2003). Em geral, os complexos teloméricos nucleoprotéicos possibilitam que as células diferenciem extremidades cromossômicas naturais de quebras de DNA em dupla fita. Sem a proteção dos telômeros, os terminais cromossômicos ativariam as vias de reparo de DNA as quais

sinalizariam a célula para interromper a divisão levando-a a senescência ou apoptose (BAILEY et al., 1999; BOULTON & JACKSON, 1998).

A extremidade 3' "G-overhang" é conservada entre os eucariotos (MAKAROV et al., 1997), formando estruturas características e agindo, sobretudo, como substrato para alongação dos telômeros pela enzima telomerase (KLOBUTCHER et al., 1981; HENDERSON & BLACKBURN, 1993; BLACKBURN, 2001) e para a interação de proteínas teloméricas envolvidas na manutenção do tamanho e proteção dos terminais cromossômicos (FERNANDEZ et al., 2004; EVANS & LUNDBLAD, 1999; SMOGORZEWSKA & DE LANGE, 2004). Na maioria dos organismos a telomerase é responsável pela replicação e manutenção telomérica contribuindo para a estabilidade do genoma e sua integridade, fatores esses que são importantes para o funcionamento de um organismo e sua propagação (BLACKBURN, 2001).

A estrutura das regiões finais dos cromossomos de *Leishmania* é semelhante à de outros eucariotos. Nas adjacências destas regiões terminais encontra-se a região subteloamérica denominada de LCTAS ("*Leishmania conserved telomere-associated sequence*"). Nela estão blocos de sequências conservadas (CSB1 e CSB2), que são considerados sítios de interação para proteínas teloméricas (FU & BARKER, 1998, CONTE & CANO, 2005). Embora à semelhança de outros eucariotos, pouco se conhece sobre a função dos telômeros em cromossomos de *Leishmania*, que também são preservados pela ação da ribonucleoproteína telomerase (CANO ET AL., 1999, GIARDINI ET AL., 2006).

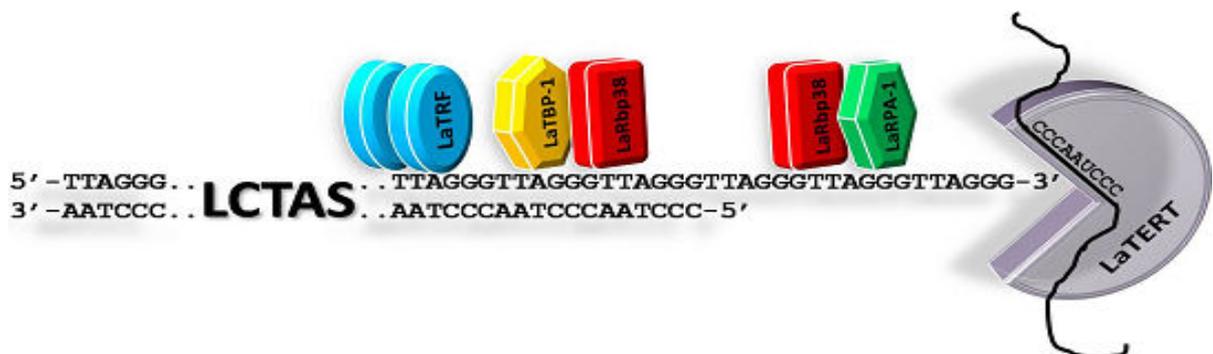
#### **1.4. Complexo telomérico em *Leishmania amazonensis***

Três complexos protéicos foram identificados em *Leishmania amazonensis*, os quais se associam *in vitro* a simples fita do DNA telomérico rico em G (FERNANDEZ et al., 2004). Através de métodos bioquímicos, foram identificadas em nosso laboratório duas proteínas que compõe dois desses complexos. Sendo elas a LaRPA-1 (*Leishmania amazonensis Replication Protein A-1*) e a LaRbp38 (*Leishmania amazonensis RNA binding protein 38*), ambas alvo de estudo deste trabalho (FERNANDEZ et al., 2004). Está demonstrado que *in*

vivo estas proteínas interagem e se co-localizam nos telômeros do parasita (LIRA et al., 2007c, SIQUEIRA-NETO et al., 2007). Resultados recentes do nosso grupo utilizando ensaios *in vitro* (cromatografia, imunoprecipitação e *pull-down*) mostram que estas proteínas co-eluem em colunas cromatográficas, e fazem parte de um mesmo complexo protéico onde está presente também a telomerase (DA SILVA et al., dados não publicados).

Foram identificadas também proteínas que se associam com a dupla fita do DNA telomérico: LaTBP1 (*Leishmania amazonensis* Telomere Binding Protein 1), LaRbp38 (LIRA et al., 2007b e 2007c) e LaTRF (*Leishmania amazonensis* TTAGGG Repeat Binding Factor) (DA SILVA et al., 2010) e um esquema atual sobre a composição da cromatina telomérica destes protozoários pode ser encontrada na Fig.1.

No momento, estamos em busca de novos componentes deste complexo e por isso, neste projeto, estamos propondo a padronização do ensaio de duplo híbrido, que poderá ao menos confirmar nossos recentes achados utilizando ensaios *in vitro*, que sugerem a existência de interações entre LaRPA-1 e LaRbp38.



**Figura 1- Representação esquemática dos telômeros de Leishmania.** Composto por uma porção dupla-fita, o DNA telomérico é formado pela repetição TTAGGG em tandem, seqüências subteloáticas (LCTAS - *Leishmania Conserved Telomere Associated Sequences*) e uma protrusão 3'G-overhang. Os formatos coloridos correspondem às proteínas já identificadas interagindo com o DNA telomérico na forma de dupla fita: LaTRF, LaTBP1, LaRbp38 e simples fita: LaRbp38, LaRPA-1 e a enzima telomerase (LaTERT) com seu componente RNA intrínseco contendo a seqüência complementar da seqüência telomérica (Figura: LIRA et al., 2007c).

### 1.5. Funções da proteína RPA nos telômeros

A proteína RPA (*Replication Protein A*) é conservada evolutivamente nos eucariotos e considerada o principal ligante de DNA simples fita. Ela geralmente é encontrada na forma de um heterotrîmero composto pelas subunidades: RPA-1, RPA-2 e RPA-3, que foi

inicialmente identificado cumprindo função no processo de replicação do DNA do vírus símeo 40 (SV40) (WOLD & KELLY, 1988, STILLMAN et al., 1992).

Hoje se sabe que estas proteínas apresentam múltiplas funções no metabolismo do DNA, pois participam das maquinarias de replicação, reparo, recombinação, “checkpoints” de ciclo celular, transcrição e manutenção dos telômeros (LONGHESE et al., 1994, WOLD, 1997, SMITH et al., 2000, LONGHESE, 2008).

A RPA aparece transientemente nos telômeros durante a fase S do ciclo celular em humanos o que leva a especular se, similarmente às leveduras, existe uma interação direta entre a maquinaria telomérica e as maquinarias de replicação (VERDUN e KARLSEDER, 2006; CHAI et al., 2006). Através de interações com outras proteínas a RPA também interfere na regulação dos telômeros (LONGHESE, 2008).

Em *Leishmania*, uma das subunidades, a LaRPA-1 (GenBank Acc. [AY493356](#)) foi encontrada em extratos nucleares positivos para a atividade de telomerase e foi isolada juntamente com a LaRbp38, em coluna de afinidade ao DNA telomérico simples fita rico em G (FERNANDEZ et al., 2004).

A RPA-1 (que na maioria dos eucariotos é denominada de RPA70, de acordo com seu tamanho em kiloDaltons), em *Leishmania* e outros protozoários, tem massa molecular aparente de 51 kDa e não apresenta um dos 4 domínios *OB-fold*, denominado RPA1-70N, apresentando somente semelhança com os domínios RPA1-A, RPA1-B e RPA1-C. O domínio RPA1-70N interage com diversos ativadores de transcrição, incluindo o supressor de tumor p53 e ainda durante o ciclo celular, interage, com proteínas das maquinarias de “checkpoint” de dano ao DNA (JACOBS et al., 1999) e estimula a atividade da DNA polimerase alfa. Ainda não se sabe se outra proteína ou se um dos domínios de LaRPA-1 exerce e/ou acumula estas funções.

A subunidade RPA-1 também apresenta funções essenciais na manutenção dos telômeros de vários eucariotos, participando principalmente do recrutamento da telomerase (SMITH et al., 2000, SCHRAMKE et al., 2004, KIBE et al., 2007, KOBAYASHI et al., 2010). Em leveduras, esta capacidade é mediada por sua interação com a proteína Est1 que, junto

a RPA, recruta a telomerase para os telômeros na fase S do ciclo celular (SCHRAMKE et al., 2004).

A proteína RPA tem a habilidade de impulsionar a atividade de helicases de WRN (*Werner syndrome*) e BLM (*Bloom syndrome*), encontradas em complexos que estimulam a desnaturação da dupla-fita de DNA em regiões longas de dupla-fita telomérica previamente ligadas à TRF2 ("*TTAGGG repeat-binding factor 2*") *in vivo* (OPRESKO et al., 2002), aventando que todas estas proteínas atuam em uma mesma via nos terminais cromossômicos.

Atualmente foi revelado em leveduras e humanos a existência de um complexo telomérico com função independente na replicação dos telômeros, denominado CST (Cdc13, Stn1 e Ten 1). Várias evidências sustentam a idéia de que esse complexo forme uma versão evolutivamente "moderna" do complexo trimérico RPA, pois as proteínas que formam o complexo CST são estruturalmente semelhantes a cada um dos componentes do trímero RPA e comprovadamente cumprem funções semelhantes (GAO et al. 2007, SUN et al. 2009). Em mamíferos, por exemplo, junto com o complexo shelterin (complexo de proteínas com características específicas que interage com o DNA telomérico e participa na sua defesa, neste contexto *shelter* refere-se a escudo), o complexo CST é responsável pela manutenção e estabilidade telomérica (MIYAKE et al., 2009; SUN, et al., 2009; WELLINGER, 2009).

Apesar da sequência gênica das outras subunidades do trímero estarem presentes no genoma de *Leishmania* elas não aparecem co-eluindo com a LaRPA-1 em colunas de afinidade ao DNA telomérico rico em G (FERNANDEZ et al., 2004). Além disso, não foram encontradas proteínas estrutural ou funcionalmente homólogas as proteínas teloméricas CDC13 e POT1 no genoma de Kinetoplastida, embora como a LaRPA-1 são ligantes da simples fita telomérica rica em G em leveduras e vertebrados, respectivamente. Por isso, questionamos se nestes parasitas essa função é exercida e acumulada pela LaRPA-1. Por isso, confirmar as interações já conhecidas da LaRPA-1, assim como encontrar novos

interatores desta proteína nos ajudará a compreender a dinâmica do funcionamento dos telômeros destes protozoários primitivos.

### **1.6. Funções da proteína Rbp38 nos telômeros**

Codificada por um gene nuclear, esta proteína parece ser conservada somente entre protozoários da família dos tripanosomatídeos, pois não existem homólogos conhecidos em outros eucariotos que estejam descritos nos bancos de dados públicos (LIRA et al., 2007c). A Rbp38 denominada LaRbp38 (GenBank Acc. [AY485300](#)), foi isolada a partir de extratos nucleares e mitocondriais de *L. amazonensis*, juntamente com a LaRPA-1 e co-localiza no núcleo e nas mitocôndrias do parasita de forma dependente da fase do ciclo celular (PEREZ et al., dados não publicados).

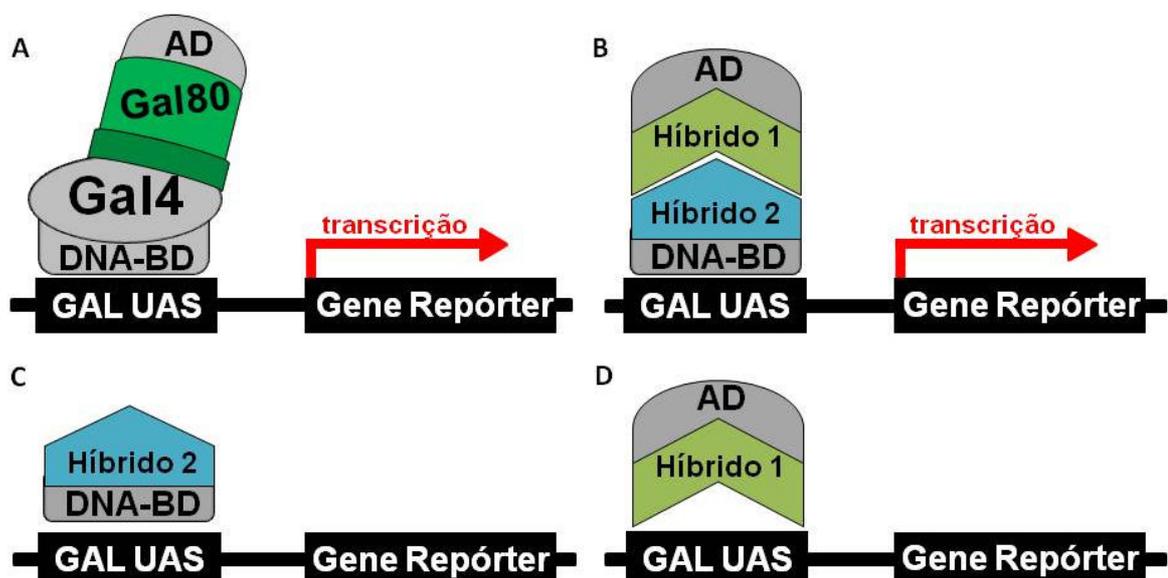
A Rbp38 é capaz de interagir *in vitro* e *in vivo* com o DNA telomérico simples fita rico em G e também com DNA de cinetoplasto (mais precisamente com a origem de replicação de mini-círculo) e com DNA telomérico na forma de dupla fita (FERNANDEZ et al., 2004, LIRA et al., 2007c). Estes dados sugerem a possibilidade da proteína Rbp38 ter função tanto nuclear quanto mitocondrial e a identificação de seus interatores é fundamental para se compreender as funções exercidas por ela nestes compartimentos celulares.

### **1.7. O sistema duplo híbrido como ferramenta para estudar interações *in vivo* entre proteínas**

O ensaio duplo híbrido em leveduras é uma técnica usada para estudar interações entre duas proteínas que podem estar envolvidas em vários processos celulares. O estudo destas interações permite identificar proteínas associadas, caracterizar interações previamente conhecidas e até manipular tais interações (FIELDS & STERNGLANZ, 1994).

O ensaio de duplo híbrido foi concebido usando-se o conhecimento sobre o metabolismo da galactose em leveduras, o qual é determinado por uma rede de interações entre diferentes fatores de ativação da transcrição (FIELDS & SONG, 1989). Neste contexto, quando a levedura absorve a galactose presente no meio, esta será convertida em

galactose-6-fosfato por seis enzimas que são reguladas transcricionalmente pelas proteínas Gal80, Gal3 e Gal4. A Gal4 é um “transativador”, pois atua como o ligante de DNA através de seu sítio de interação com o DNA (BD, *binding domain*) e interage com outras proteínas da via pelo seu domínio de ativação (AD, *activation domain*). A Gal80 é um ligante do AD de Gal4 causando a inibição da transcrição do gene repórter, porém, na presença de galactose no meio, a Gal3 liga-se a Gal80, causando uma alteração conformacional na Gal80, expondo assim, o domínio de ativação de Gal4 à maquinaria de transcrição. Portanto, Gal4, só funciona como ativador da transcrição quando ligado ao promotor do gene repórter, e quando seu domínio de ativação está exposto à maquinaria de transcrição. Explorando esse fato, a técnica do duplo híbrido surgiu quando foi visto que, usando uma construção de Gal80 (proteína inibidora de Gal4) fusionada com o sítio AD e com um domínio ligante à Gal4, ocorria a interação de GAL80 com Gal4 e subsequentemente a transcrição pela simples exposição do AD a maquinaria de transcrição, independentemente se a proteína que esteja interagindo com Gal4 seja seu próprio inibidor, como é o caso de Gal80 (SOBHANIFAR S., 2003).



**Figura 2- Representação esquemática mostrando como ocorre a ativação de transcrição do promotor do gene repórter.** Em A, a construção de Gal80 associa-se a Gal4 ativando a transcrição do gene repórter a montante, via o domínio de interação ao DNA (BD) de Gal4 na sequência de ativação (UAS, *upstream activation sequence*) e pela exposição do domínio de ativação (AD) de Gal4. Em paralelo, como demonstrado em B, se houver a interação entre os híbridos 1 e 2 ocorrerá a indução da transcrição do gene repórter. Nos esquemas C e D, mostramos que um híbrido sozinho não é capaz de ativar a transcrição do gene repórter. (UAS = *upstream activation sequence*).

Em vista disto, o ensaio de duplo híbrido é realizado, por exemplo, expressando-se em levedura duas proteínas com potencial de interação, uma apresentando fusão com o domínio de interação com o DNA (DB) de Gal4 (híbrido 1 ou isca) e a outra fusionada ao domínio de ativação (AD) de Gal4 (híbrido 2 ou presa). Se houver interação (não covalente) entre as proteínas, o híbrido 1 (isca) se liga à sequência de ativação (UAS) e o híbrido 2 (presa) interage com o fator de transcrição via AD e ativa a transcrição do gene repórter a montante de UAS (Fig. 2B). Desta forma, um único híbrido não é capaz de ativar a transcrição do gene repórter (SOBHANIFAR, 2003) (Fig. 2C-D).

Este sistema também pode ser usado para delinear domínios ou resíduos críticos para uma interação e para a identificação de proteínas que se ligam a uma proteína de interesse (híbrido 1, “isca”), sendo que o híbrido 2 (“presa”) será isolado a partir de um pool de plasmídeos contendo cDNAs ligados ao domínio de ativação de Gal4 (biblioteca).

Os domínios de ligação a DNA de Gal4 e LexA; e de ativação de Gal4 e Herpes vírus VP16 são os domínios mais usados neste sistema, sendo Gal4 e LexA proteínas diméricas (SOBHANIFAR, 2003).

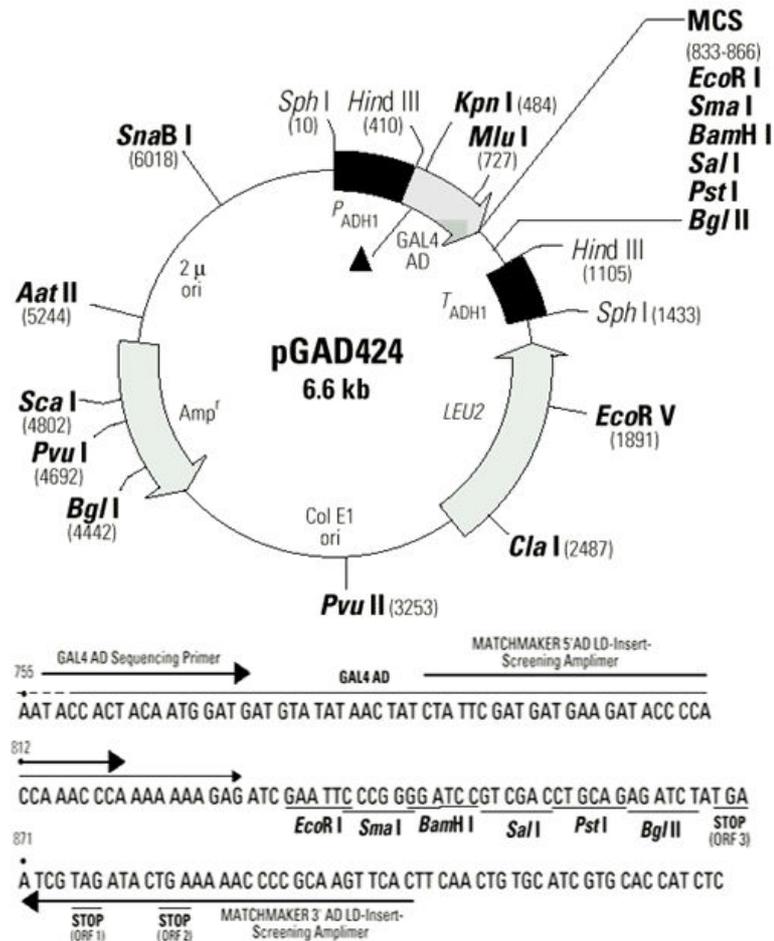
## **2. Hipótese a ser testada e racional do projeto**

Como mencionado anteriormente, entre os componentes do complexo telomérico de *Leishmania amazonensis* foram identificados as proteínas LaRPA-1 (*L. amazonensis* Replication Protein A-1) e a LaRbp38 (*L. amazonensis* RNA binding protein). Mais recentemente, utilizando-se ensaios de imunoprecipitação e de captura por “pull-down” foi demonstrado que estas proteínas fazem parte de um mesmo complexo protéico nos telômeros do parasita (DA SILVA & PEREZ et al, em preparação).

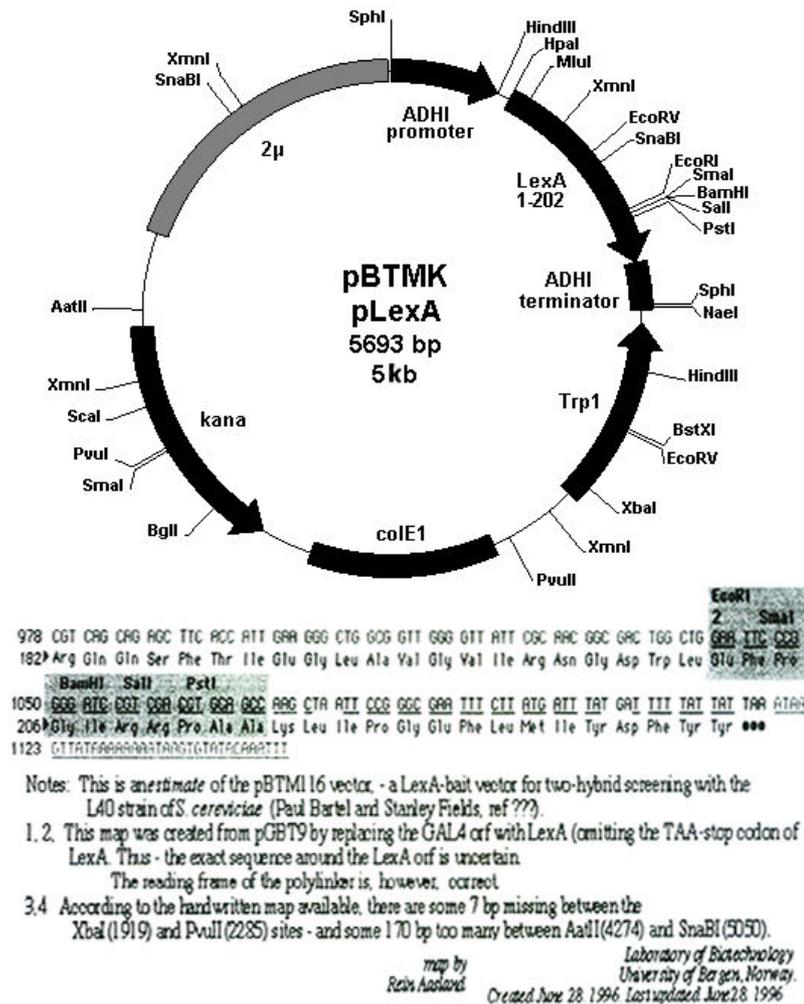
Este trabalho pretende confirmar estas possíveis interações entre as proteínas teloméricas LaRPA-1 e LaRbp38 de *L. amazonensis*, utilizando o sistema duplo híbrido.

Para tal, pretende-se subclonar o gene que codifica a proteína LaRbp38 no vetor pBTMK, conhecido como pBTM116 (BÉRANGER et al., 1997), onde foi modificado o gene que agora confere resistência a kanamicina, e que permite que a proteína saia em fusão

com o domínio de ligação ao DNA de LexA, e subclonar o gene que codifica a proteína LaRPA-1 no vetor pGAD424, que permite que a proteína saia em fusão com o domínio de ativação de Gal4 (vide mapa dos vetores na Fig. 3 e 4).



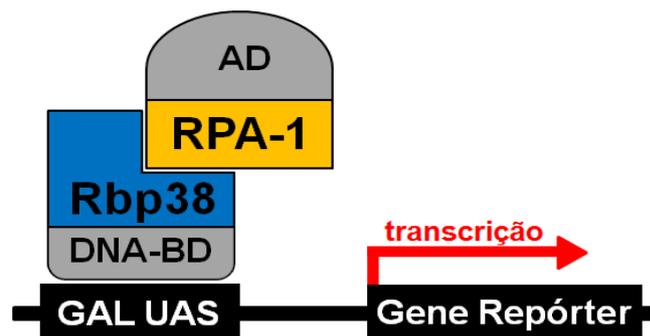
**Figura 3-** Mapa e sítio de policlonagem dos vetores pGAD424. O vetor pGAD424 codifica para o domínio de ativação (AD; a.a 768-881) do fator de transcrição de Gal4 de leveduras (Clontech Matchmaker).



**Figura 4-** Mapa e sítio de policlonagem do vetor pBTMK. O vetor pBTMK codifica para o domínio de ligação ao DNA (BD) do fator de transcrição de LexA (Rein Aasiand, University of Bergen).

Em resumo, a sequência que codifica para proteína LaRbp38 será clonada no vetor pBTMK, que expressa o marcador de seleção *TRP1* e permite que a proteína de interesse seja expressa em fusão com o domínio de ligação a DNA de LexA, permitindo assim a produção das proteínas “LaRbp38-BD” (híbrido 1 ou “isca”). O gene que a proteína LaRPA-1 foi subclonado no vetor pGAD424, o qual expressa o marcador de seleção *LEU2* e permite que a proteína de interesse seja expressa em fusão com o domínio de ativação de GAL4 possibilitando assim a produção das proteínas “LaRPA-1-AD” (híbrido 2 ou “presa”). Essas construções foram co-transformadas em levedura, linhagem “L40” (*MAT<sup>+</sup> trp1 his3 leu2 ade2 LYS2::lexAop(4x)-HIS3 URA3::lexAop(8x)-lacZ*) de *Saccharomyces cerevisiae*, que expressa os genes repórteres heterólogos *HIS3* e *LacZ*, controlados pela sequência de

ativação UAS. Se ocorrer a interação entre uma das proteínas de interesse (isca) e uma das proteínas interativas (presa) a transcrição dos "gene repórteres" é ativada. Em resumo, esta interação proteína-proteína será revelada pela associação da proteína isca com o DNA (na sequência UAS) e do domínio AD (fusionado a proteína presa) com o fator de transcrição, resultando na expressão dos genes repórteres *his+* (enzima da via de biossíntese da histidina) e a  $\beta$ -galactosidase (LacZ).



**Figura 5- Representação esquemática da possível interação entre as proteínas Rbp38 e RPA-1.** Na figura a RPA-1 está fusionada ao domínio de ativação da Gal4, tornando-se a proteína "isca", enquanto que a Rbp38 está fusionada ao domínio de ligação ao DNA da LexA, é a proteína "presa". Ocorrendo esta interação, a transcrição do gene repórter será ativada.

Para compreender melhor como se darão estas possíveis interações, nestes ensaios ambas as proteínas serão testadas reciprocamente como isca (fusionada ao domínio de ligação ao DNA de LexA) e presa (fusionada ao domínio de ativação de Gal4), sendo um método de controle interno que facilitará a análise dos resultados.

Assim, os clones positivos, ou seja, que indicam a interação entre as proteínas de interesse serão identificados em meio mínimo na ausência de triptofano, leucina e histidina e pela produção da  $\beta$ -galactosidase que na presença de X-GAL faz com que a colônia de levedura adquira a cor azul.

### 3. Objetivo

Este projeto teve como principal objetivo determinar a interação *in vivo* das proteínas LaRPA-1 e LaRbp38 utilizando o sistema genético de seleção em levedura, o sistema duplo-híbrido.

#### Objetivos específicos

1. A subclonagem do gene que codifica a LaRPA-1 no vetor pGAD424 que permite a expressão em fusão com o AD de Gal4, foi realizada pela Dra. Cristina Lira, ex-aluna de doutorado do laboratório (ver metodologia para detalhes). Por este motivo, para este clone, será obtido DNA plasmidial para subsequente transformação em leveduras L40.

2. Checagem de autoativação do gene repórter por transformação simples dos plasmídeos recombinantes que codificam as iscas e presas em levedura, utilizando-se cultura em meio mínimo específico.

3. Co-transformação de leveduras L40 com as construções LexA-LaRbp38 e LaRPA-1-AD, seleção de clones positivos em meio mínimo (SD-Leu-Trip), re-seleção em meio mínimo SD-Leu-Trip-His e verificação da expressão de  $\beta$ -gal, confirmando a possível interação entre as proteínas.

### 4. Metodologia

#### 4.1. Subclonagem do gene *LaRPA-1* no vetor pGAD424 (domínio de ativação)

Esta clonagem foi realizada pela Dra. Cristina Lira, ex-aluna de doutorado do laboratório e está resumida como se segue. O gene *LaRPA-1* foi separado do vetor pCR2.1 TOPO (Invitrogen) e após digestão com a enzima de restrição *EcoRI* (Amersham Biosciences), foi purificado em gel de agarose 1% e eluído utilizando-se o kit Perfectprep Gel Cleanup System (Eppendorf). Para a clonagem desse inserto, o vetor pGAD424 também foi digerido com *EcoRI* (ver mapa do vetor na Fig. 3) e em seguida defosforilado com CIP (Calf Intestinal Phosphatase, New England Biolabs) por 30 minutos na

concentração de 0,5 U de enzima/ $\mu\text{g}$  de vetor. O vetor e o inserto foram ligados utilizando-se T4 DNA ligase (USB), segundo especificação do fabricante. A mistura de ligação foi utilizada para transformar bactérias competentes, *E. coli* DH5 $\alpha$  (SAMBROOK et al., 2001). As bactérias transformadas foram cultivadas em LB-Amp (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) por 16 horas e o DNA plasmidial foi purificado utilizando-se o Kit Perfectprep® Plasmid Mini (Eppendorf). Após a clonagem, o vetor foi denominado pGAD-RPA. A clonagem foi verificada por PCR e por sequenciamento. Para dar andamento aos próximos passos do projeto, fizemos a extração do DNA plasmidial através do Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) e transformação de leveduras L40, como descrito adiante.

#### **4.2. Subclonagem do gene *LaRbp38* no vetor pBTMK (domínio de interação com DNA)**

O gene *LaRbp38* clonado em vetor pBTMK foi adquirido após otimização de códons e síntese gênica pela empresa GenScript.

#### **4.3. Transformação de leveduras da linhagem L40**

As linhagens de leveduras L40 foram mantidas replaqueando-as a cada 15 dias em meio sólido YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) para manter sempre culturas novas para realizar as transformações.

Nas transformações as leveduras L40 foram cultivadas em meio líquido YPD por 16-18 hr a 30°C com agitação de 200 rpm. As culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 3 min a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em tampão de transformação (PEG 50% 3.350, Acetato de Lítio 2M, TE 10X e DTT 1M), agitadas no vortex, e em seguida foi acrescentado o ssDNA concentrado em 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (DNA esperma de salmão utilizado como carreador de DNA) que foi previamente desnaturado a 95°C por 10 min e resfriado no gelo por 3 min. Nesta suspensão foi adicionado DNA plasmidial (por ex, pGAD, pGAD-RPA, pBTMK ou pBTMK-Rbp38), seguindo de incubação por 40 min a 45°C com agitação a 200 rpm. Após a centrifugação a 3000 rpm por 5 min a temperatura ambiente removeu-se parte do sobrenadante para

plaquear o resto em meio mínimo seletivo. Este processo foi repetido para as construções pGAD-RPA, pBTMK-Rbp38, e posteriormente nas co-transformação pGAD-RPA/pBTMK-Rbp38, pGAD/pBTMK, pGAD/pBTMKRbp, pGAD-RPA.

As transformações foram plaqueadas em meio mínimo respectivo à auxotrofia dos vetores. As misturas das co-transformações foram primeiramente plaqueadas em meio mínimo SD/-leu-trip para determinar a eficiência da co-transformação e posteriormente foram plaqueadas em meio mínimo SD-Leu-Trip-His na ausência e na presença de 3AT (inibidor de *HIS3*) para aumentar a estringência na escolha dos transformantes.

#### **4.4. Teste de auto-ativação da transcrição do gene repórter *HIS3***

O teste com a droga 3-AT, inibidor competitivo do produto da expressão do gene *HIS3*, visa analisar num nível de maior estringência se ocorre auto-ativação e/ou interação crescendo os transformantes em placas com meio mínimo SD-Leu-Trip-His.

Foram testadas individualmente as construções pGAD-RPA, pGAD vazio, pBTMK-Rbp38 e pBMTK vazio em meio SD-Leu-His ou SD-Trip-His. Posteriormente foram testadas as co-transformações pGAD vazio + pBTMK vazio, pGAD-RPA + pBTMK vazio e pGAD vazio + pBMTK-Rbp38, todos em meio SD-Leu-Trip-His. Foi testado também a construção pGAD-RPA + pBTMK-Rbp para analisar em maior estringência o grau da possível interação. Isto serviu para conferir se todos estes híbridos têm capacidade de auto-ativar a transcrição do gene repórter, evitando assim resultados falsos positivos.

#### **4.5. Teste de expressão do gene repórter de $\beta$ -galactosidade na presença de X-gal**

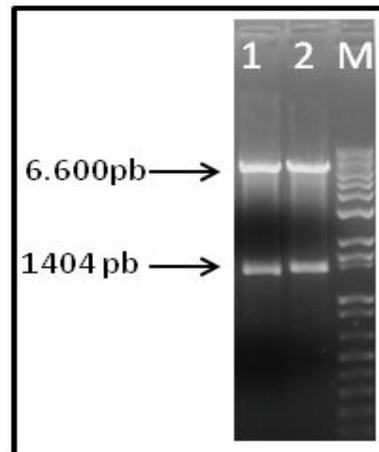
Foram testadas todas as leveduras co-transformadas para avaliar se há ou não expressão do gene repórter de  $\beta$ -gal. O método consiste em colocar um papel filtro sobre as colônias crescidas em meio SD-Leu-Trip, onde estas ficarão aderidas, e, numa placa de petri vazia se coloca um filtro novo e acima dele se coloca o filtro com as colônias na parte superior, onde será aplicado a solução Z-Buffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  87mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  47mM, KCl

19mM e  $MgSO_4$  1,38mM) com 20mM  $\beta$ -mercaptoetanol e X-gal (0,5mg/ml). Caso as colônias fiquem azuis, significa que houve interação entre as construções co-transformadas que ativaram a expressão do gene repórter  $\beta$ -gal, caso negativo, é uma indicação de que não houve interação.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Obtenção de DNA plasmidial do gene LaRPA-1 clonados no vetor pGAD424.

Para dar andamento aos primeiros passos do projeto, a partir dos clones previamente obtidos pela Dra. Cristina Lira, foi realizado a extração do DNA plasmidial pGAD-RPA. Estes DNAs foram digeridos com a enzima *EcoRI* para comprovar a presença dos insertos e os mesmos foram aplicados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (Fig.6)

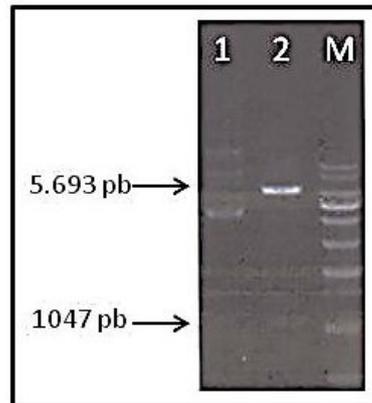


**Figura 6- Confirmação da clonagem do gene LaRPA-1 no vetor pGAD424.** A) Em gel de agarose corado com brometo de etídeo, linhas 1 e 2 temos a digestão da RPA-1 pela *EcoRI* a partir do vetor pGAD424 com o marcador de DNA 1Kb Plus DNA Ladder

A presença do inserto de tamanho esperado (RPA-1 ~ 1404 pb) após as digestões dos plasmídeos com as enzimas de restrição mostrados nas Figs. 6A (linhas 1 e 2) comprova o sucesso da clonagem, uma vez que os sequenciamentos destes plasmídeos já haviam sido feitas.

## 5.2. Subclonagem do gene *LaRbp38* no vetor pBTMK

O gene *LaRbp38* clonado em vetor pBTMK foi adquirido após otimização de códons e síntese gênica pela empresa GenScript. A presença do inserto clonado no vetor pBTMK foi confirmada por digestão conforme mostrado na Fig.7 linha 2 e por sequenciamento automático de DNA (dados não mostrados).

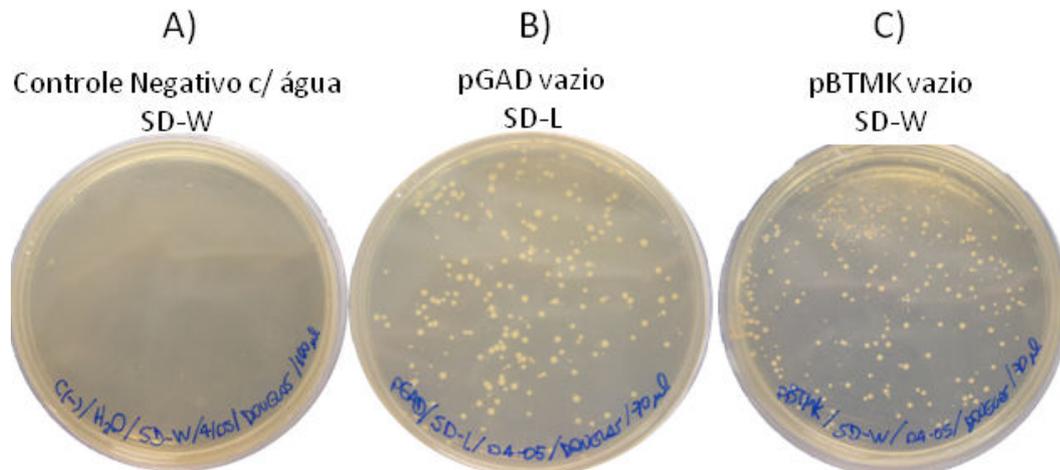


**Figura 7- Gel de agarose mostrando a presença do inserto Rbp38 no vetor pBTMK.** Em 1 temos o plasmídeo não digerido, em 2 temos a digestão da Rbp38 pelas enzimas *EcoRI* e *Sall* a partir do vetor pBTMK e em M temos o marcador de DNA KB Ladder.

## 5.3. Transformações dos vetores vazios em leveduras L40

Dando início as primeiras transformações em leveduras L40, inoculamos uma colônia de leveduras L40 em 5 ml de meio líquido YPD por 16-18 hr a 30°C com agitação de 200 rpm. No dia seguinte foi retirado uma alíquota de 1 ml para cada uma das transformações pGAD, pBTMK e 1 ml para o controle negativo. Essas alíquotas de 1 ml foram centrifugadas, os sobrenadantes foram descartados e as células foram ressuspensas em tampão de, agitadas no vortex, e em seguida foi acrescentado ssDNA. Destas três suspensões, em uma foi adicionado o vetor pGAD, noutra o vetor pBTMK e na terceira foi adicionado água no lugar do plasmídeo, sendo este o controle negativo, seguindo então pela incubação. Após a centrifugação foram plaqueados em meio mínimo seletivo. A transformação do pGAD foi plaqueada em meio mínimo SD-Leu, pois o vetor pGAD confere auxotrofia para Leucina, a

transformação do pBTMK e o Controle negativo foram plaqueados em meio mínimo SD-Trip, pois o vetor pBTMK confere auxotrofia para Triptofano.. A quantidade de DNA plasmidial utilizado por reação de transformação foi de aproximadamente 300ng.



**Figura 8- Transformações dos vetores vazios (pGAD424 e pBTMK) em leveduras L40.** Em A) temos o controle negativo plaqueado em meio mínimo SD-Trip, em B) temos a transformação do vetor pGAD424 plaqueado em meio mínimo SD-Leu e em C) temos a transformação do vetor pBTMK plaqueado em meio mínimo SD-Trip (W = Trip = Triptofano e L = Leu = Leucina).

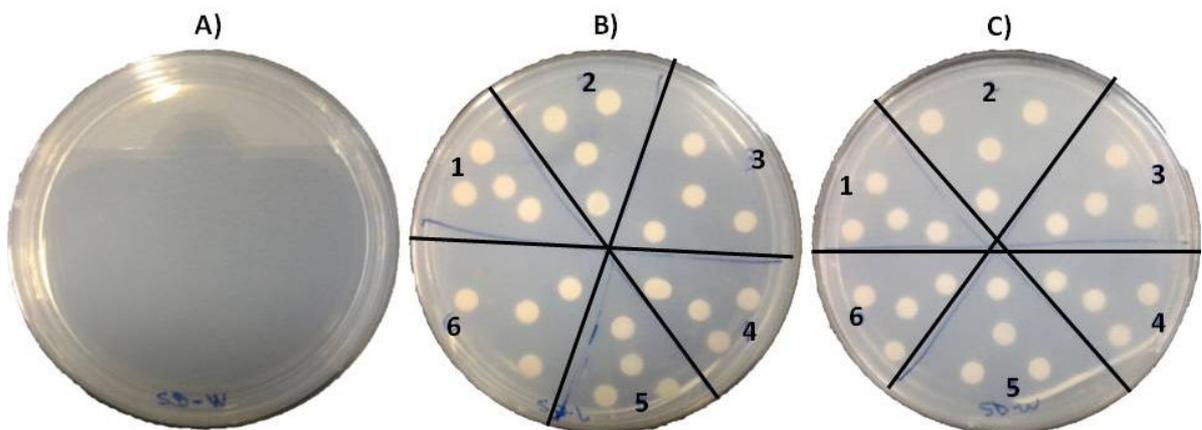
Esse resultado (exibido na fig. 8) mostra o sucesso da transformação dos vetores vazios, uma vez que só poderiam crescer nos respectivos meios mínimos as leveduras que possuísem a auxotrofia conferida pelo respectivo vetor após o evento de transformação.

#### **5.4. Transformação da leveduras L40 em triplicata com os plasmídeos pGAD-RPA, pGAD vazio, pBTMK-Rbp38 e pBTMK vazio**

Para obter os co-transformantes necessários para realizar os testes de interação, primeiramente foi necessário obter os transformantes isolados.

Para isso, foi inoculada uma colônia de leveduras L40 em meio líquido YPD por 16-18 hr a 30°C com agitação de 200 rpm. No dia seguinte foi retirado uma alíquota para cada uma das transformações e para o controle negativo. Essas alíquotas de foram centrifugadas, os sobrenadantes foram descartados e as células foram ressuspensas em tampão de transformação, agitadas, e em seguida foi acrescentado ssDNA. Destas

suspensões, em uma foi adicionado o plasmídeo pGAD-RPA e noutra foi adicionado o pBTMK-Rbp38 e na última foi adicionado água no lugar do plasmídeo, sendo este nosso controle negativo, seguindo então pela incubação. Após a centrifugação, foram plaqueados em meio mínimo seletivo. As transformações do pGAD-RPA foi plaqueada em meio mínimo SD-Leu, pois o vetor pGAD confere auxotrofia para Leucina, a transformação do pBTMK-Rbp38 e o controle negativo (transformado com água) foram plaqueados em meio mínimo SD-Trip, pois o vetor pBTMK confere auxotrofia para Triptofano. A quantidade de DNA plasmidial utilizado por reação de transformação foi de aproximadamente 300ng.

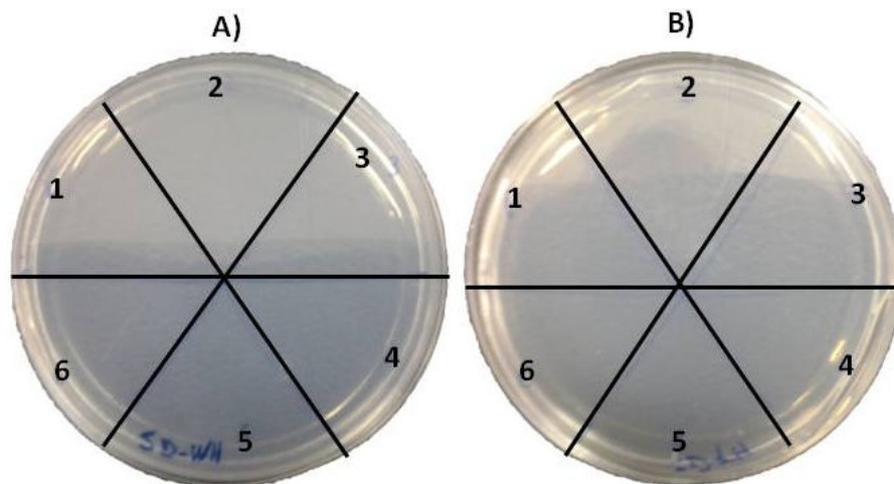


**Figura 9- Teste de transformação dos recombinantes pGAD-RPA (LaRPA-1-AD) e pBTMK-Rbp38 (LaRbp38-BD) em leveduras L40.** Em A) temos o controle negativo transformado com água e plaqueado em meio mínimo SD-Trip. Em B), no meio mínimo SD-Leu, de 1 a 3 temos 3 diferentes transformações do vetor vazio pGAD, e, de 4 a 6 temos 3 diferentes transformações da construção pGAD-RPA. Em C), no meio mínimo SD-Trip de 1 a 3 temos 3 diferentes transformações do vetor vazio pBTMK, e, de 4 a 6 temos 3 diferentes transformações da construção pBTMK-Rbp.

Esse resultado (exibido na fig. 9) mostra o sucesso na transformação dos recombinantes pGAD-RPA (LaRPA-1-AD) e pBTMK-Rbp38 (LaRbp38-BD), uma vez que só poderiam crescer nos respectivos meios mínimos as leveduras que possuísem a auxotrofia conferida pelo respectivo plasmídeo após o evento de transformação.

### 5.5. Teste de autoativação em triplicata das construções LaRPA-1-AD e LaRbp38-BD e dos vetores vazios pGAD e pBTMK

Para prosseguir com as co-transformações precisamos antes verificar se as construções isoladamente podem autoativar o promotor do gene repórter *HIS3*. Para isto, nos meios mínimos, além de retirar os respectivos aminoácidos referentes às auxotrofias dos vetores, retiramos também a histidina, sendo assim, só haverá colônias nas placas se houver autoativação do gene repórter. Então, retiramos uma colônia da transformação pGAD e pGAD-RPA para repicarmos em placas com meio mínimo SD-Leu-His, e retiramos uma colônia da transformação pBTMK e pBTMK-Rbp38 para repicarmos em placa com meio mínimo SD-Trip-His.

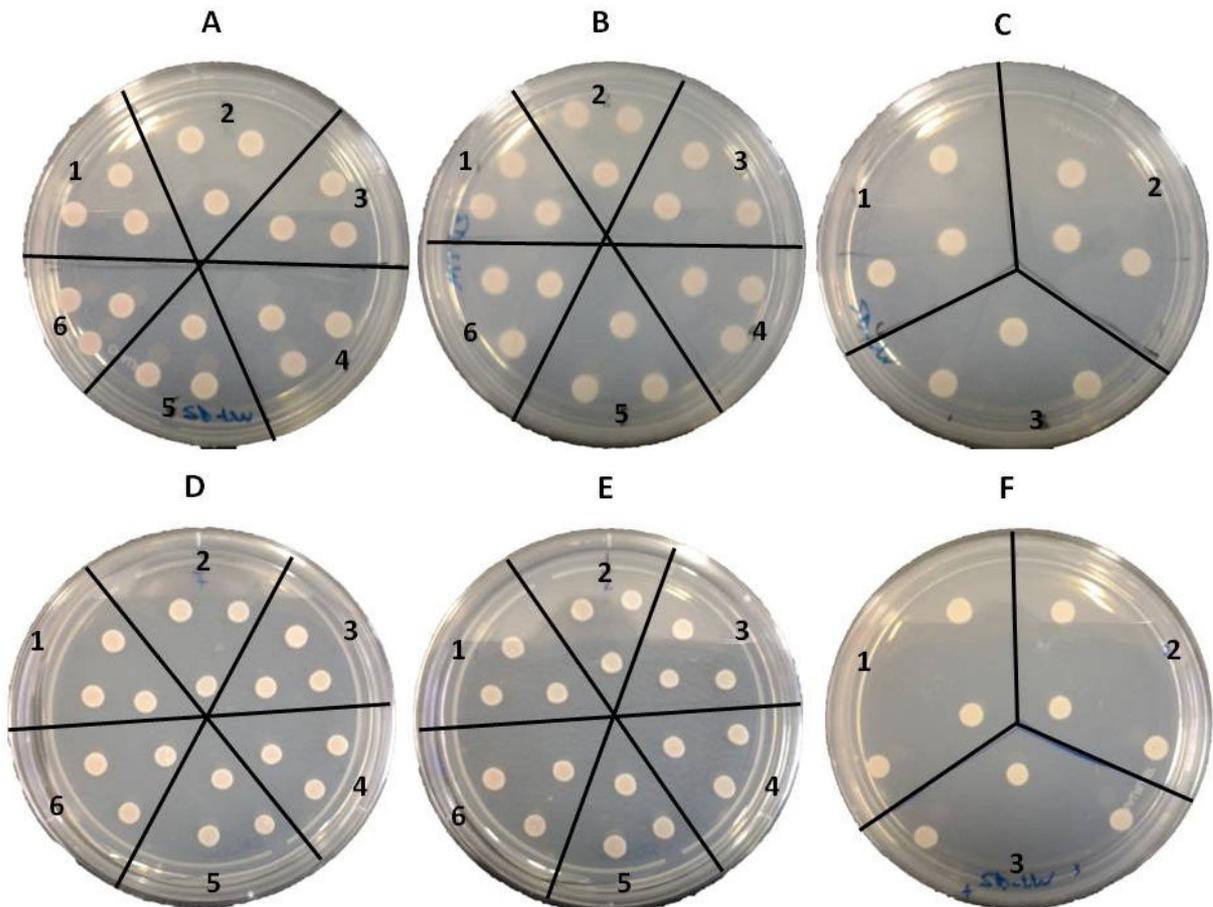


**Figura 10- Os recombinantes LaRPA-1-AD e LaRbp38-BD não autoativam o promotor de *HIS3*.** Em A, no meio mínimo SD-Trip-His, de 1 a 3 temos 3 diferentes transformações do vetor vazio pBTMK, e, de 4 a 6 temos 3 diferentes transformações da construção pBTMK-Rbp. Em B, no meio mínimo SD-Leu-His de 1 a 3 temos 3 diferentes transformações do vetor vazio pGAD, e, de 4 a 6 temos 3 diferentes transformações da construção pGAD-RPA.

O sucesso do resultado do teste autoativação (mostrado na fig. 10) demonstra que não há autoativação por nenhum dos recombinantes transformados isoladamente, uma vez que só cresceriam leveduras no meio SD-Leu-Trip-His caso houvesse autoativação do promotor do gene repórter de *HIS3* por um dos recombinantes, permitindo assim prosseguir com as co-transformações.

### **5.6. Construção dos híbridos pBTMK/pGAD, pBTMK-Rbp38/pGAD-RPA, pBTMK/pGAD-RPA e pGAD/pBTMK-Rbp38 e do controle positivo pBTMK(+)/pACT(+)**

Para obter os híbridos necessários para os testes mais avançados de interação, similarmente às reações de transformação com os plasmídeos individuais mostrados no tópico 6.4, nesta etapa usamos inóculos de leveduras pré-transformadas com os plasmídeos de interesse. Foram realizadas as seguintes co-transformações em triplicata: a) pBTMK/pGAD (ambos plasmídeos vazios), b) pBTMK-Rbp38/pGAD-RPA, c) pBTMK/pGAD-RPA, d) pGAD /pBTMK-Rbp38 e e) pACT(+)/pBTMK(+) (plasmídeos para controle positivo). Para isso, inoculamos uma colônia de cada uma das leveduras L40 pré-transformadas com um dos plasmídeos em meio mínimo líquido SD com a marca de auxotrofia específica. No dia seguinte foram retiradas uma alíquota de cada uma destas co-transformações. Essas alíquotas foram centrifugadas, os sobrenadantes foram descartados e as células foram ressuspensas em tampão de transformação, agitadas, e em seguida foi acrescentado ssDNA e aproximadamente 300ng de DNA plasmidial. Numa suspensão do vetor pGAD vazio foi adicionado o vetor pBTMK vazio e noutra o plasmídeo pBTMK-Rbp38; numa suspensão do plasmídeo pBTMK-Rbp38 foi adicionado o plasmídeo pGAD-RPA e noutra o plasmídeo pGAD vazio; na suspensão do plasmídeo pACT(+) foi adicionado o plasmídeo pBTMK(+). Após a centrifugação a temperatura ambiente, removeu-se o sobrenadante de cada reação para plaquear os transformantes em meio mínimo seletivo SD-Leu-Trip. Durante a realização desses experimentos, usamos como controle positivo a combinação pACT(+) e pBTMK(+) pois esta combinação é um falso positivo que ativa a transcrição dos genes repórteres (Fig. 11).

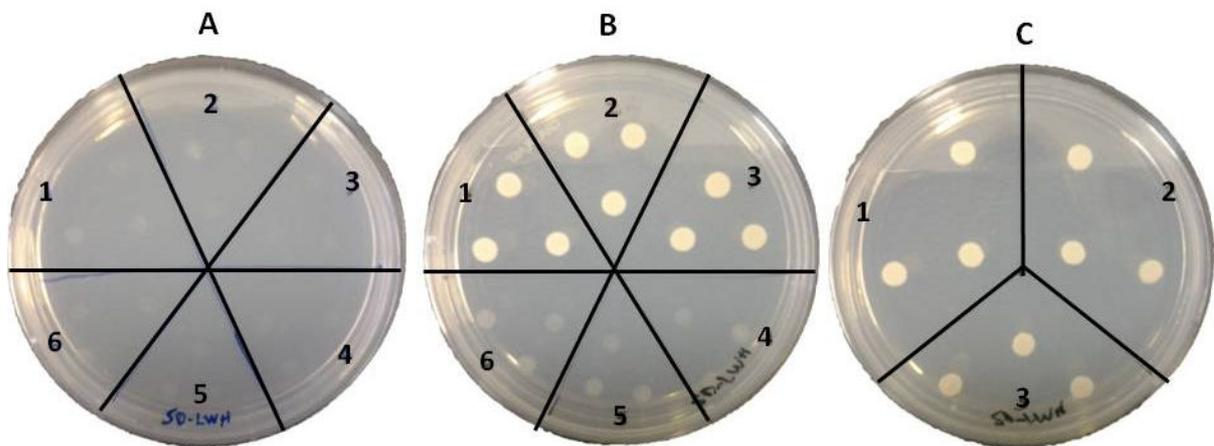


**Figura 11- Crescimento dos co-transformantes em meio mínimo SD-Leu-Trip.** Em A e D, de 1 a 3, temos 3 diferentes co-transformações do vetor pGAD mais a construção pBTMK-Rbp, e, de 4 a 6 temos 3 diferentes co-transformações do vetor vazio pGAD mais o vetor vazio pBTMK. Em B e E, de 1 a 3 temos 3 diferentes co-transformações do vetor vazio pBTMK mais a construção pGAD-RPA, e, de 4 a 6 temos 3 diferentes co-transformações da construção pBTMK-Rbp mais a construção pGAD-RPA. Em C e F, de 1 a 3 temos 3 diferentes co-transformações do controle positivo (pACT(+)/ pBTMK(+)).

O sucesso nas co-transformações pode ser verificado na Figura 11, onde só cresceriam as leveduras que possuíssem ambos plasmídeos que conferem auxotrofia para Leucina e Triptofano, permitindo-as perpetuarem em meio mínimo SD-Leu-Trip. Para realizar mais testes e verificar a reprodutibilidade dos mesmos, foram feitas triplicatas de co-transformações realizadas com o mesmo sucesso, seguindo o método descrito acima. Este teste é importante por demonstrar efetivamente o sucesso na implementação da técnica do duplo híbrido em nosso laboratório, um dos principais objetivos deste projeto, sendo esta comprovada pela presença de ambos plasmídeos na levedura, permitindo então o estudo de outras interações pelo sistema do duplo híbrido.

### 5.7. Teste de autoativação dos co-transformantes

Com todos os co-transformantes prontos foi necessário verificar se as construções controles poderiam autoativar o promotor do gene repórter *HIS3* e realizar o primeiro teste de interação entre LaRPA-1-AD e LaRbp38-BD (pGAD-RPA/pBTMK-Rbp38). Para isto, nos meios mínimos, além de retirar os respectivos aminoácidos referentes às auxotrofias dos vetores, retiramos também a histidina, sendo assim, neste meio de cultura (SD-Leu-Trip-His) só cresceriam os transformantes que de alguma forma ativassem o promotor do gene repórter *HIS3*.



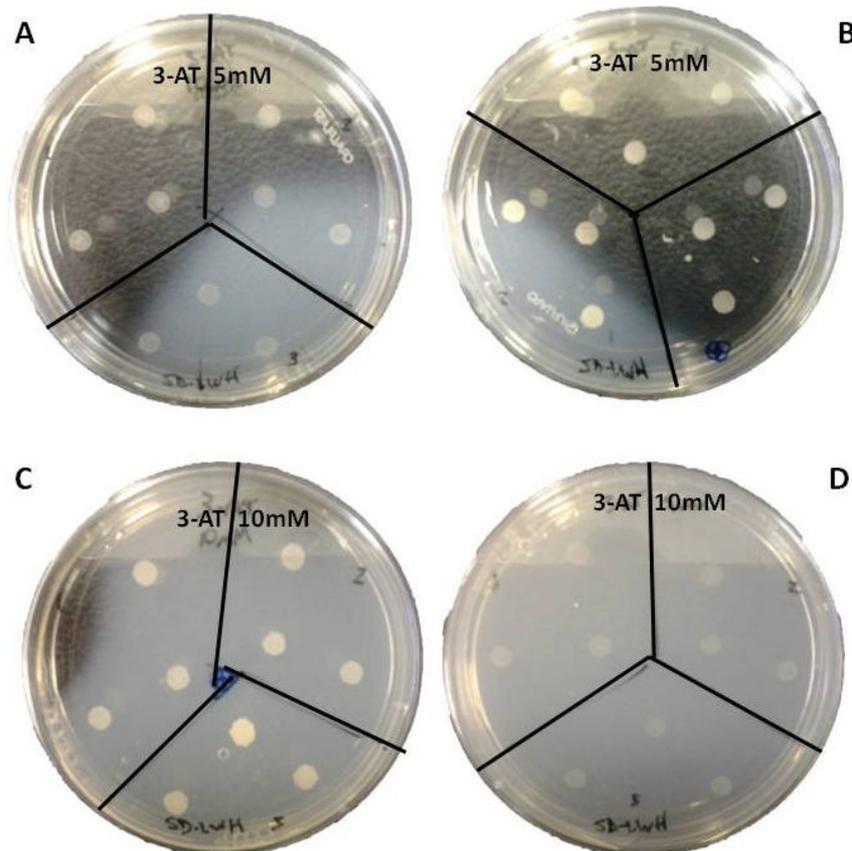
**Figura 12- Teste de ativação do promotor de *HIS3*.** Para este teste todos os co-transformantes foram plaqueados em SD-Leu-Trip-His. Em A, de 1 a 3, temos 3 diferentes co-transformações do vetor pGAD mais a construção pBTMK-Rbp, e, de 4 a 6 temos 3 diferentes co-transformações do vetor vazio pGAD mais o vetor vazio pBTMK. Em B, de 1 a 3 temos 3 diferentes co-transformações do vetor vazio pBTMK mais a construção pGAD-RPA, e, de 4 a 6 temos 3 diferentes transformações da construção pBTMK-Rbp mais a construção pGAD-RPA. Em C, de 1 a 3 temos 3 diferentes co-transformações do controle positivo (pACT(+)/pBTMK(+)) em triplicatas.

O resultado do teste de autoativação dos co-transformantes (Fig. 12) mostra que não houve autoativação entre as construções pGAD/pBTMK, pGAD/pBTMKRbp, que houve autoativação pelas construções pBTMK/pGADRPA e pACT(+)/pBTMK(+), e que não houve interação expressiva de pGADRPA/pBTMKRbp. Como esperado, o controle positivo autoativou o promotor do gene repórter para *HIS3*, porém, um dos controles negativos (pBTMK/pGADRPA) autoativou o promotor do gene repórter para *HIS3* enquanto que a construção que era objeto deste estudo (pGADRPA/pBTMKRbp) não interagiu expressivamente, isso ocorreu talvez porque os co-transformantes cresceram pouco e

lentamente, necessitando de mais tempo de cultivo durante o teste, que foi realizado em 5 dias. Portanto partimos para o teste do 3AT para verificar se estes resultados se alteravam ou se repetiam.

### 5.8. Teste de inibição competitiva de *HIS3* utilizando a droga 3-AT

O teste com a droga 3-AT, inibidor competitivo do produto da expressão do gene *HIS3*, visa analisar num nível de maior estringência se ocorre autoativação e/ou interação entre as proteínas recombinantes expressas na levedura quando cultivadas em meio mínimo SD-Leu-Trip-His.

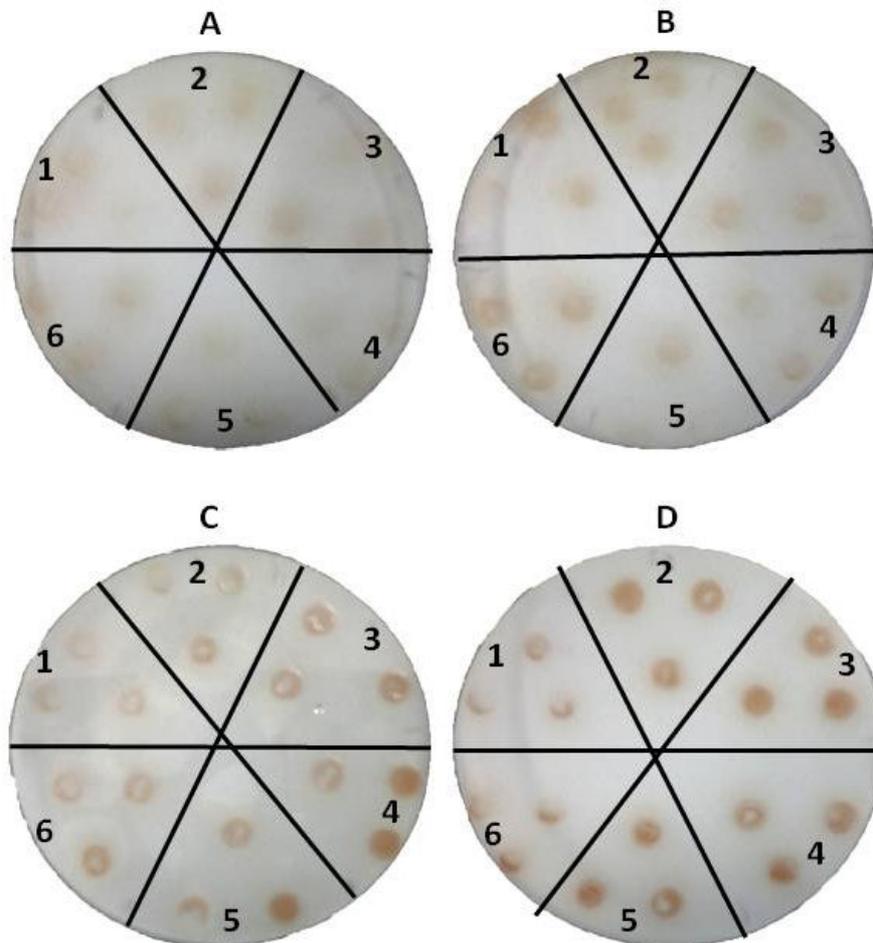


**Figura 13- Teste dos co-transformantes em meio SD-Leu-Trip-His contendo competidor de His3, a droga 3-AT.** Em A), de 1 a 3, temos 3 diferentes co-transformações de pGAD-RPA + pBTMCRbp no meio mínimo SD-Leu-Trip-His com a concentração da droga 3-AT em 5mM. Em B), de 1 a 3, temos 3 diferentes co-transformações de pACT(+) + pBTMK(+) no meio mínimo SD-Leu-Trip-His com a concentração da droga 3-AT em 5mM. Em C), de 1 a 3, temos 3 diferentes co-transformações de pACT(+) + pBTMK(+) no meio mínimo SD-Leu-Trip-His com a concentração da droga 3-AT em 10mM. Em D), de 1 a 3, temos 3 diferentes co-transformações de pGAD-RPA + pBTMCRbp no meio mínimo SD-Leu-Trip-His com a concentração da droga 3-AT em 10mM.

Neste teste com a droga 3-AT, confirmou-se mais uma vez a auto-ativação do promotor do gene repórter de *HIS3* pelos controles positivos e aparentemente não pode ser visto uma interação expressiva dos co-transformantes pGAD-RPA/pBTMCRbp, assim como ocorreu no teste de autoativação isso se deva talvez porque os co-transformantes cresceram pouco e lentamente, necessitando de mais tempo de cultivo durante o teste, que foi realizado em 5 dias também.

### **5.9. Teste de expressão do gene repórter de $\beta$ -gal na presença de X-gal**

O método consiste em colocar um papel filtro sobre a placa com as colônias, onde estas ficarão aderidas, e, numa placa de petri vazia se coloca um filtro novo, e acima dele se coloca o filtro com as colônias na parte superior, onde será aplicado a solução Z-Buffer com  $\beta$ -mercaptoetanol e X-gal. Caso os as proteínas expressas pelos co-transformantes apresentem interação, as colônias ficarão azuis, significando que houve ativação da expressão do gene repórter  $\beta$ -gal. Caso não ocorra interação entre as proteínas, não ocorrerá expressão de  $\beta$ -gal.



**Figura 14- Teste de interação proteína:proteína pela expressão de  $\beta$ -gal.** Em A e C, de 1 a 3, temos 3 diferentes co-transformações do vetor pGAD mais a construção pBTMK-Rbp, e, de 4 a 6 temos 3 diferentes co-transformações do vetor vazio pGAD mais o vetor vazio pBTMK. Em B e D, de 1 a 3, temos 3 diferentes co-transformações do vetor vazio pBTMK mais a construção pGAD-RPA, e, de 4 a 6 temos 3 diferentes transformações da construção pBTMK-Rbp mais a construção pGAD-RPA.

Em ambos os testes não foi detectada a produção de  $\beta$ -gal pelas leveduras, indicando que não houve auto-ativação pelos controles. Por esta metodologia não foi possível detectar interações entre os co-transformantes pBTMK-Rbp/pGAD-RPA, sugerindo que ou a interação entre as proteínas é fraca, ou que ela não pode ser observada por esta metodologia. De qualquer forma estes testes deverão ser repetidos mais vezes visto que existe uma ampla variedade de protocolos na literatura.

## 6. Considerações Finais

Os resultados obtidos neste estudo, mostram que ocorre a autoativação do promotor do gene repórter de *HIS3* por um dos controles negativos (pBTMK/pGAD-RPA) e também uma inexpressiva interação entre as proteínas LaRPA-1 e LaRbp38 usando a construção pGAD-RPA/pBTMK-Rbp38. A literatura prediz que esta metodologia é passível da ocorrência de alguns problemas, inclusive que algumas proteínas não podem ter suas interações estudadas pelo sistema do duplo híbrido. Segundo relatado pelo manual da Clontech “MatchMaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3”, estes resultados de difícil interpretação podem ter causa específica entre elas: a instabilidade de uma ou ambas as proteínas quando expressas a partir dos vetores recombinantes, ou enovelamento incorreto da(s) proteína(s) recombinante(s) provocando a oclusão do domínio de interação desta(s) ao promotor, ou a incorreta localização subcelular da(s) proteína(s) recombinante(s), não permitindo seu encaminhamento ao interior do núcleo devido a sua conformação (VAN AELST et al., 1993). Frente a estes problemas, estamos construindo outros recombinantes invertendo a isca, ou seja, a LaRPA-1 passaria a estar fusionada no domínio de ligação ao DNA (LaRPA-1-BD) e LaRbp38 passaria a estar fusionada com o domínio de ativação (LaRbp38-AD) numa tentativa de contornar estes problemas.

Foi possível considerar que apesar de não terem sido obtidos resultados muito conclusivos em relação a interação entre LaRPA-1 e LaRbp38, o sistema do duplo híbrido foi implementado em nosso laboratório, com sucesso, haja vista que a obtenção e análise dos co-transformantes foi bastante reprodutível, abrindo assim portas para novos estudos de interação proteína:proteína através deste sistema *in vivo*.

## Abstract

Leishmaniasis is a group of infectious diseases caused by parasites of the genus *Leishmania*, which affect millions of people worldwide, causing each year two million new cases and 70.000 deaths. The drugs used in the treatment of different clinical forms of the disease show high toxicity and low efficacy causing many side effects which collaborates with the appearing of drug-resistant parasites and vectors. Because of these difficulties, the development of new therapies to treat this parasitic disease is encouraged by the World Health Organization (WHO) and a greater knowledge about the molecular biology of these protozoa may facilitate these discoveries. Telomeres, the nucleoproteic structures at the terminals of eukaryotic chromosomes, have been the subject of intense studies aiming to use them as therapeutic targets against malignant tumors and pathogens. Telomeres are generally shown as a dynamic structures where interactions between DNA and proteins occur, resulting in the formation of the telomeric complex, which is responsible for the protection and maintenance of chromosomes and genome stability, characterizing an essential function for cell viability. Telomeric complex components of *Leishmania amazonensis* were identified by biochemical assays using telomerase positive extracts. Among these components, the proteins LaRPA-1 (*L. amazonensis* Replication Protein A-1) and LaRbp38 (*L. amazonensis* RNA binding protein) were identified presenting the ability to interact with telomeric DNA *in vitro* and *in vivo*. Recently, by immunoprecipitation and "pull-down" capture assays, it was possible to show that these proteins are part of the same complex in parasite telomeres. This work aimed to confirm the possible interactions between the telomeric proteins LaRPA-1 and LaRbp38 using the *in vivo* analysis system known as yeast two-hybrid. The aim is to standardize this methodology in our laboratory, because it will allows to study protein:protein interactions using a simple method.

Individual transformants were obtained with plasmids pGAD, pGAD-RPA, and pBTMK pBTMK-Rbp38 in order to test for yeast auxotrophy in minimal media and to test for the autoactivation of the reporter gene promoter (*HIS3*). Later, the cotransformations pGAD/pBTMK, pGAD-RPA/pBTMK, pGAD/pBTMK-Rbp38 (negative controls), pACT(+)/pBTMK(+) (positive control) and pGAD-RPA/pBTMK-Rbp38 (target of the study) were carried out for testing autoactivation of *HIS3* promoter in the presence of 3-AT, the competitive inhibitor of *HIS3* product. Finally, the transformants were tested for the expression of  $\beta$ -gal in the presence of X-gal, to confirm previous results obtained for the *HIS3* reporter.

Autoactivation of the promoter of the *HIS3* gene reporter by one of the negative controls (pBTMK/pGAD-RPA) was observed, as well as an inexpressive interaction between the proteins LaRPA-1 and LaRbp38 using the construction pGAD-RPA/pBTMK-Rbp38. The

literature predicts that the two-hybrid system is likely to present problems such as protein interactions that cannot be studied by this methodology. According to the Clontech MatchMaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 manual, the difficulty in the interpretation of some results may have specific causes as following: the instability of one or both proteins when expressed from recombinant vectors or the incorrect folding of recombinant(s) protein(s) causing occlusion of the interaction domain(s) or incorrect subcellular location(s) of recombinant(s) protein(s), preventing its transport to the interior of the nucleus due to its conformation. Considering that, we are actually constructing other recombinants where the bait was changed for the prey, or more specifically LaRPA-1 will be fused to the DNA binding domain (LaRPA-1-BD) and LaRbp38 will be fused to the activation domain (LaRbp38-AD), in an attempt to solve these problems.

Despite of the inconclusive results regarding the interaction between LaRPA-1 and LaRbp38, the yeast two-hybrid system was successfully implemented in our laboratory, opening doors to new studies of protein:protein interactions through this *in vivo* system.

**Keywords:** leishmaniasis, *Leishmania amazonensis*, telomeres, LaRPA-1, LaRbp38, two-hybrid.

## Referências Bibliográficas

- . ARIAS, J., MONTEIRO, P., ZICKER, F. (1996). The reemerge of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emm. Infect. Dis.*, 2, 145-146.
- . BAILEY, S.M., MEYNE, J., CHEN, D.J., KURIMASA, A., LI, G.C., LEHNERT, B.E. & GOODWIN, E.H. (1999) DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 14899–14904.
- . BEVERLEY, S.M. (1991) Gene amplification in Leishmania. *Annu Rev Microbiol.* 45, 417-44.
- . BÉRANGER, F., ARESTA A., DE GUNZBURG, J., CAMONIS, J (1997) Getting more from the two-hybrid system: N-terminal fusions to LexA are efficient and sensitive baits for two-hybrid studies. Oxford Univ. Press, Vol. 25, 10, 2035–2036
- . BLACKBURN, E.H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 106, 661-673.
- . BOULTON, S.J., JACKSON, S.P., (1998) Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J* 17, 1819-1828.
- . CANO, M.I., DUNGAN, J., AGABIAN, N. & BLACKBURN, E.H. (1999). Telomerase in Kinetoplastid Parasitic Protozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3616-3621.
- . CHAI, W., DU, Q., SHAY, J. W. e WRIGHT, W. E. (2006). Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands. *Mol. Cell* 21, 427–435.
- . CHAN, S. R. & BLACKBURN, E. H. (2004) Telomeres and telomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359, 109-121.
- . CONTE, F. F. & CANO, M. I. (2005) Genomic organization of telomeric and subtelomeric sequences of Leishmania (Leishmania) amazonensis. *Int J Parasitol* 35, 1435-1443.
- . DA SILVA, M. S., PEREZ, A. M., DA SILVEIRA, R. C. V., DE MORAES, C. E., SIQUEIRA-NETO, J. L., FREITAS-JUNIOR, L. H. AND CANO, M. I. N. (2010) The Leishmania amazonensis TRF (TTAGGG repeat-binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres. *BMC Microbiology* 10, 136.
- . DMITRIEV, P. V., PETROV, A. V. & DONTSOVA, O. A. (2003) Yeast telosome complex: components and their functions. *Biochemistry (Mosc)* 68, 718-734.
- . EVANS, S. & LUNDBLAD, V. (1999) Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* 286, 117-120.
- . FERNANDEZ, M. F., CASTELLARI, R. R., CONTE, F. F., GOZZO, F. C., SABINO, A. A., PINHEIRO, H., NOVELLO, J. C., EBERLIN, M. N., CANO, M. I. N. (2004) Identification of three proteins that associate in vitro with the Leishmania (Leishmania) amazonensis G-rich telomeric strand. *Eur J Biochem*, 271, 3050-63.
- . FIELDS, S. & STERNGLANZ R. (1994) The two hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trands Genet*, 10, 286-292.
- . FIELDS, S. & SONG O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340, 245-246.
- . FU, G. & BARKER, D. (1998) Characterisation of leishmania telomeres reveals unusual telomeric repeats and conserved telomere-associated sequence. *Nuc. Ac. Res.*, 26, 2161-2167.
- . FUNASA. (2000) Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana 5ª Edição (revisada): Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses – Coordenação de Vigilância Epidemiológica - Centro Nacional de Epidemiologia. Fundação Nacional de Saúde.
- . GAO, H., R. B. CERVANTES, E. K. MANDELL, J. H. OTERO, V. LUNDBLAD, 2007 RPA-like proteins mediate yeast telomere function. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 208–214.
- . GENARO, O., DA COSTA, C., WILLIAMS, P., SILVA, J., ROCHA, M. LIMA, S., MAYRINK, W. (1990). Ocorrência de calazar em área urbana da grande Belo Horizonte, M.G. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 23, 121-121.

- . GIARDINI, M. A, LIRA, C. B, CONTE, F. F., CAMILLO, L. R., SIQUEIRA NETO, J. L., RAMOS, C. H., CANO, M. I.N. (2006) The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*, gene cloning and characterization. *Parasitol Res.* 98, 447-54.
- . HENDERSON, E. & BLACKBURN, E. (1993) An overhang 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol. Cell Biol.* 9, 345-348.
- . IVENS, A. C., PEACOCK, C. S., WORTHEY, E. A. & OTHER AUTHORS. (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309, 436-442.
- . ITO H, FUKUDA Y, MURATA K, KIMURA A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153,163-168.
- . JACOBS, D.M., LIPTON, A.S., ISERN, N.G., DAUGHDRILL, G.W., LOWRY, D.F., GOMES, X., WOLD, M.S. (1999) Human replication protein A: global fold of the N-terminal RPA-70 domain reveals a basic cleft and flexible C-terminal linker. *J Biomol NMR.* 14, 321-31.
- . JOHNSTON, D. A., BLAXTER, M. L., DEGRAVE, W. M., FOSTER, J., IVENS, A. C. & MELVILLE, S. E. (1999) Genomics and the biology of parasites. *Bioessays* 21, 131-147.
- . KEDZIERSKI, L., ZHU, Y., HANDMAN, E. (2006) *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitology.* 133 Suppl, S87-112.
- . KIBE T, ONO Y, SATO K, UENO M. (2007). Fission Yeast Taz1 and RPA Are Synergistically Required to Prevent Rapid Telomere Loss. *Mol Biol Cell.* 11, 246-251.
- . KLOBUTCHER, L.A., SWANTON, M.T., DOMINI, P., PRESCOTT, D.M. (1981) All gene sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May;78(5), 3015-9.
- . KOBAYASHI, Y., SATO, K., KIBE, T., SEIMIYA, H., NAKAMURA, A., YUKAWA, M., TSUCHIYA, E., UENO, M. (2010). Expression of Mutant RPA in Human Cancer Cells Causes Telomere Shortening. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74(2), 90496-1-4.
- . 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. e CANO, M. I. N. (2007c). LaRbp38, a *Leishmania amazonensis* protein that binds nuclear and kinetoplast DNAs. *Biochem. Biophys. Res Comm*, 358, 854-860.
- . LONGHESE MP, PLEVANI P, LUCCHINI G. (1994) Replication factor A is required in vivo for DNA replication, repair, and recombination. *Mol Cell Biol.* 14, 7884-90.
- . LONGHESE, M. P. (2008). DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres *Genes and Dev.* 22, 125-140.
- . MAKAROV VL, HIROSE Y, LANGMORE JP. (1997) Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell.* Mar 7;88(5), 657-66.
- . MIYAKE, Y., NAKAMURA, M., NABETANI, A., SHIMAMURA, S., TAMURA, M., YONEHARA, S., SAITO, M. e ISHIKAWA, F. (2009). RPA-like Mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 Complex Binds to Single-Stranded DNA and Protects Telomeres Independently of the Pot1 Pathway. *Molecular Cell* 36, 193–206.
- . NEVES, D.P., MELO, A.L., GENARO, O. & LINARDI, P.M. (2000). *Parasitologia Humana.* 10a Edição, Ed. Atheneu, pp. 31-72.
- . OPRESKO, P.L., VON KOBBE, C., LAINE, J.-P., HARRIGAN, J., HICKSON, I.D. & BOHR, V. (2002) Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom Syndrome helicases. *J. Biol. Chem.*, 275, 41110-41119.

- . PEACOCK, C. S., SEEGER, K., HARRIS, D., et al. (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 39, 839-847.
- . REY, L. (2001) *Parasitologia*, Ed. Guanabara Koogan S.A., 214-266.
- . REY, L. (2001) *Parasitologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan.
- . REY, L. (2002) *Parasitologia*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- . ROSE M. and, D. BOTSTEIN (1983) Construction and use of gene fusions *lacZ* ( $\beta$ -galactosidase) which are expressed in yeast. *Methods Enzymol.* **101**, 167-180.
- . SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- . SCHRAMKE, V., LUCIANO, P., BREVET, P., GUILLOT, S., CORDA, Y., LONGHESE, M.P., GILSON, E & GÉLI, V. (2004) RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends. *Nature Gen.* 36, 46-54.
- . SEGOVIA, M. (1994) *Leishmania* gene amplification: a mechanism of drug resistance. *Ann Trop Med Parasitol.* 88, 123-30.
- . SIMPSON L. (1987) The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol.* 41, 363-82.
- . SIQUEIRA NETO, J. L., LIRA, C. B. B., GIARDINI, M. A., KHATER, L., PEREZ, A. M., PERONI, L. A., DOS REIS, J. R. R., FREITAS-JUNIOR, L. H., RAMOS, C. H. I., CANO, M. I. N. (2007). *Leishmania* Replication Protein A- binds in vivo single-stranded telomeric DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun. Biochem. Biophys. Res. Commun.*,doi,10.1016/j.bbrc.2007.04.144.
- . 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. & de LANGE, T. (2004) Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 177–208.
- . SOBHANIFAR S. (2003) Yeast Two Hybrid Assay: A Fishing Tale, *BioTeach Journal*, 81-87
- . STILES, J. K., HICOCK, P. I., SHAH, P. H. e MEADE, J. C. (1999). Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol* 93, 781-807.
- . STILLMAN B, BELL SP, DUTTA A, MARAHRENS Y. (1992) DNA replication and the cell cycle. *Ciba Found Symp.* 170, 147-56; discussion 156-60.
- . SUN, J., E. Y. YU, Y. YANG, L. A. CONFER, S. H. SUN et al., 2009 Stn1-Ten1 is an Rpa2-Rpa3-like complex at telomeres. *Genes Dev.* 23, 2900–2914.
- . VAN AELST, L., BARR, M., MARCUS, S., POLVERINO, A. & WIGLER, M. (1993) Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6213-6217
- . VERDUN, R. E. e KARLSEDER, J. (2006). The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. *Cell* 127, 709–720.
- . WELLINGER, R. J. (2009). The CST Complex and Telomere Maintenance: The Exception Becomes the Rule. *Molecular Cell* 36, 168-169.
- . 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.
- . WOLD, M.S. (1997) Replication Protein A: A Heterotrimeric, Single-Stranded DNA-Binding Protein Required for Eukaryotic DNA Metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 61-91.
- . WOLD MS, KELLY T. (1988) Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85, 2523-7.
- . WHO EXPERT COMMITTEE (1990). Control of the leishmaniases. World health organization, Geneva. *Technical report Series*, 793.
- . WHO – World Health Organization (2000). WHO report on global surveillance of epidemic--prone infectious diseases. WHO/CDS/CSR/ ISR/2000.1.