

“Clonagem, expressão e purificação de três mutantes truncados da proteína LaRPA-1 de *Leishmania amazonensis*”

Trabalho de conclusão de curso

RAPHAEL SOUZA PAVANI

Orientador: Prof. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano

Co-orientador: Arina Marina Perez

Botucatu - 2011

Raphael Souza Pavani

Clonagem, expressão e purificação de três mutantes truncados da proteína LaRPA-1 de *Leishmania amazonensis*

Monografia apresentada ao Departamento de Genética do Instituto de Biociências – UNESP, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano

BOTUCATU – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Pavani, Raphael Souza.

Clonagem, expressão e purificação de três mutantes truncados da proteína LaRPA-1 de *Leishmania amazonensis* / Raphael Souza Pavani. – Botucatu : [s. n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Maria Isabel Nogueira Cano

Co-orientador: Arina Marina Perez

Capes: 20202008

1. Genética molecular. 2. Clonagem molecular. 3. Leishmania.

Palavras-chave: LaRPA-1; Leishmaniose; *Leishmania amazonensis*; Telômeros; Mutantes truncados.

Agradecimentos

*Agradeço primeiramente a Deus, por abençoar toda minha caminhada durante a graduação.

*Aos meus pais, pela força que me transmitiram, pela compreensão, pela preocupação, por todo o esforço, nunca deixando nada faltar. Sem o amor e o apoio de ambos eu não teria chegado até aqui hoje.

*A minha orientadora, Prof. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano, por toda a paciência, apoio, auxílio, amizade e principalmente por instigar meu lado científico, nunca esquecendo de colocar a ética em primeiro lugar.

*Aos meus companheiros de laboratório, Arina, Marcelo, Paulo, João, Jomar e Rita pela boa vontade em me ensinar os fundamentos de se trabalhar em um laboratório e pela paciência de me auxiliar em diversos experimentos. Agradeço também pelo bom humor e amizade, que deixavam todos os meus dias de trabalho mais agradáveis.

*A minha namorada Ana Clara Ferreira Baptista Araújo por estar sempre ao meu lado, tanto nos momentos de felicidade quanto nos de tristeza, por me apoiar e me reerguer sempre que estava por baixo, por todo amor e carinho compartilhado.

*Aos meus companheiros da República Manguaça, que me mostraram o verdadeiro valor de uma amizade e me acompanharam ao longo desse período de graduação sempre me apoiando nas minhas decisões. Com eles vivi e ainda viverei momentos inesquecíveis.

*Ao Departamento de Genética e seus funcionários, que me receberam bem para a realização do bacharelado e de meus experimentos.

*A FAPESP por financiar meu projeto dentro da universidade.

*A Biologia XLIII, meus companheiros de sala de aula, alguns se tornaram amigos pra vida inteira.

SUMÁRIO

1. Resumo.....	09
2) Introdução	
2.1 Leishmania e Leishmaniose.....	10
2.2 Ciclo de vida do parasita.....	12
2.3 Biologia molecular de parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	13
2.4 Biologia molecular dos telômeros: Estrutura e função.....	14
2.5 Complexo Telomérico em <i>Leishmania amazonensis</i>	16
2.6 A proteína RPA e suas funções nos telômeros.....	17
3) Objetivos.....	19
4) Metodologia.....	19
4.1 Cultura de parasitas.....	19
4.2 Extração do DNA genômico.....	19
4.3 Amplificação e clonagem dos mutantes de LaRPA-1.....	20
4.4 Subclonagem dos fragmentos de DNA contendo os mutantes de LaRPA-1 no vetor de expressão pET 28 a+.....	21
4.5 Produção e purificação das proteínas recombinantes.....	23
4.6 Análise da expressão dos mutantes da proteína LaRPA utilizando-se “Western-blot”.....	24
4.7 Ensaio de Dicroísmo Circular.....	24
5) Resultados e Discussão.....	25
5.1 Amplificação dos fragmentos dos 3 mutantes por PCR.....	25
5.2.1 Clonagem dos fragmentos gênicos correspondentes aos mutantes LaRPAΔObfold-1, LaRPAΔCterm e LaRPAΔObfold-1-2 no vetor TOPO.....	28
5.2.2 Subclonagem no vetor de expressão pET28a+.....	29
5.2.3 Ensaio de mini indução de expressão das proteínas LaRPAΔObfold-1, LaRPAΔCterm e LaRPAΔObfold-1-2.....	31
5.2.4 As proteínas recombinantes LaRPAΔObfold-1, LaRPAΔCterm e LaRPAΔObfold-1-2 são encontradas na fração insolúvel do extrato.....	32

5.2.5 Esquema de purificação dos três mutantes truncados de LaRPA-1.....	34
5.3.1 Purificação da proteína LaRPAΔObfold-1.....	35
5.3.2 Análise da estrutura secundária da proteína recombinante LaRPAΔObfold por espectroscopia de Dicroísmo Circular(CD).....	36
5.4.1 Purificação da proteína LaRPAΔObfold1-2.....	38
5.4.2 Análise da estrutura secundária da proteína recombinante LaRPAΔObfold1-2 por espectroscopia de Dicroísmo Circular(CD).....	39
5.5.1 Purificação da proteína LaRPAΔCterm.....	41
5.5.2 Análise da estrutura secundária da proteína recombinante LaRPAΔCterm por espectroscopia de Dicroísmo Circular(CD).....	43
5.6 As proteína LaRPAΔObfold1, LaRPAΔCterm e LaRPAΔObfold1-2 são reconhecidas pelo soro anti LaRPA-1 em ensaio de Western Blot.....	44
5.7 Estudos estruturais teóricos com a LaRPA-1.....	45
6) Referências.....	46

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos que serão utilizados nas clonagens.....	21
Tabela 2 : Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores elaborados para construção dos mutantes.....	26
Tabela 3: Predição da quantidade dos elementos de estrutura secundária da LaRPAΔObfold-1.....	37
Tabela 4: Predição da quantidade dos elementos de estrutura secundária da LaRPAΔObfold-1-2.....	40
Tabela 5 : Predição da quantidade dos elementos de estrutura secundária da LaRPAΔCterm.....	43
Figura 1: Ciclo de vida de <i>L. amazonensis</i>	13
Figura 2: Estrutura telomérica.....	15
Figura 3: Panorama atual dos telômeros de <i>Leishmania</i>	16
Figura 4: Comparação da estrutura primária das subunidade 1 da proteína RPA de vertebrados e de <i>Leishmania</i> e outros protozoários.....	19
Figura 5: Mapa do vetor de expressão pET-28a+.....	22

Figura 6: Sequência de nucleotídeos do gene que codifica a proteína LaRPA.....	26
Figura 7: Diagrama esquemático mostrando a posição de cada um dos três mutantes truncados.....	27
Figura 8 : Amplificação genômica dos três mutantes truncados do gene <i>LaRPA-1</i>	27
Figura 9: Confirmação da clonagem dos genes LaRPA Δ Obfold-1, LaRPA Δ Cterm e LaRPA Δ Obfold-1-2.....	28
Figura 10: Confirmação da subclonagem dos genes LaRPA Δ Obfold-1, LaRPA Δ Cterm, LaRPA Δ Obfold-1-2.....	30
Figura 11: Estudo de expressão dos mutantes LaRPA Δ Obfold-1, LaRPA Δ Cterm, LaRPA Δ Obfold-1-2.....	31
Figura 12: As proteínas LaRPA Δ Obfold1, LaRPA Δ Cterm e LaRPA Δ Obfold1-2 são expressas na fração insolúvel do extrato bacteriano.....	33
Figura 13 : Esquema de purificação utilizado para a obtenção das proteínas LaRPA-1 Δ Obfold1, LaRPA-1 Δ Cterm e LaRPA-1 Δ Obfold1-2.....	35
Figura 14: Esquema mostrando a localização do mutante LaRPA Δ Obfold1 em relação a LaRPA-1 de <i>Leishmania amazonensis</i>	35
Figura 15: Purificação da proteína LaRPA Δ Obfold-1.....	36
Figura 16: Espectro de CD da LaRPA Δ Obfold-1.....	37
Figura 17: Estrutura da proteína LaRPA Δ Obfold-1-2 em comparação com a LaRPA-1 de <i>Leishmania amazonensis</i>	38
Figura 18: Purificação da proteína LaRPA Δ Obfold-1-2.....	39
Figura 19: Espectro de CD da Rpa Δ Obfold-1-2 com heparina e sem heparina.....	40
Figura 20: Estrutura da proteína LaRPA Δ Cterm em comparação com a LaRPA-1 de <i>Leishmania amazonensis</i>	42
Figura 21: Purificação da proteína LaRPA Δ Cterm em coluna Hi-Trap Chelating.....	42
Figura 22: Espectro de CD da LaRPA Δ Cterm.....	43
Figura 23: As proteínas recombinantes LaRPA Δ Obfold 1, LaRPA Δ Cterm e LaRPA Δ Obfold 1-2 são reconhecidas pelo soro anti-LaRPA-1.....	44
Figura 24: Modelo estrutural teórico preliminar da LaRPA-1 em <i>cartoon</i>	46

1. Resumo

A leishmaniose é uma doença que atinge milhões de pessoas no mundo e, de acordo com a FUNASA, está se espalhando por todas as regiões do Brasil. O tratamento desta zoonose é ineficaz, pois os fármacos utilizados apresentam muitos efeitos colaterais e colaboram com o aparecimento de parasitas e vetores resistentes. Portanto um maior conhecimento sobre a biologia molecular destes protozoários poderá facilitar o descobrimento de novas terapias e desenvolvimento de drogas antiparasitárias. O complexo telomérico é formado pela interação de DNA com proteínas, sendo que estas últimas podem também interagir entre si. A proteína RPA de eucariotos compreende um complexo trimérico subdividido em três subunidades. Este cumpre independentemente ou juntamente com outras proteínas diversas funções vitais para a célula, entre elas, auxiliar na manutenção dos telômeros e ajudar a recrutar a telomerase. Além disso, ela parece ser um dos principais componentes do complexo de proteínas que interagem com o terminal simples fita telomérico de protozoários tripanosomatídeos. Curiosamente, em *Leishmania* spp., as subunidades 2 e 3, ao contrário da subunidade 1 da RPA, não fazem parte do complexo telomérico. Portanto a LaRPA-1 pode apresentar comportamentos peculiares quando comparada a RPA dos outros eucariotos, e se tornar um importante alvo ao se estudar a biologia molecular do parasita. Este trabalho tem como objetivo clonar, expressar e purificar os três diferentes mutantes truncados da proteína LaRPA-1 para, futuramente, utilizar-se estas proteínas recombinantes como ligantes em ensaios de interação proteína:proteína, visando mapear possíveis sítios ou domínios na proteína LaRPA-1. O gene que codifica LaRPA-1 já encontrava-se clonado e sequenciado no laboratório de Telômeros da UNESP de Botucatu. Três mutantes truncados, LaRPA Δ Obfold-1, LaRPA Δ Cterm e LaRPA Δ Obfold-1-2, foram construídos e amplificados por PCR utilizando-se iniciadores, que contêm sítios para enzimas de restrição, elaborados a partir da sequência putativa do gene e clonados em vetor de expressão bacteriano pET 28a+. As proteínas recombinantes foram expressas com uma cauda de 6X-Histidina na extremidade N-terminal em sua composição, a qual facilita o processo de purificação dessa proteína por cromatografia de afinidade em colunas de níquel. Os produtos de PCR dos mutantes LaRPA Δ Obfold-1, LaRPA Δ Cterm e LaRPA Δ Obfold-1 foram purificados e clonados no vetor pCR 2.1 – TOPO. Após a clonagem, ensaios de mini preparação foram realizados para a obtenção do plasmídeo TOPO+ gene de interesse. Para expressar as proteínas recombinantes, os plasmídeos foram digeridos com enzimas de restrição e os genes dos três mutantes foram subclonados no vetor de expressão pET 28a+. Ensaios preliminares em pequena escala por indução da expressão por IPTG (mini-indução) foram realizados para observação do momento em que a bactéria expressa a proteína recombinante desejada e em maior quantidade. Foi escolhido o tempo de 3 horas após a indução para os três mutantes e seguiu-se com expressão em larga escala. O extrato bacteriano foi fracionado em gel de poliacrilamida para a verificação da solubilidade da proteína. Todas elas foram encontradas na fração insolúvel dos extratos. Seguiu-se com ensaio de purificação das proteínas, as frações insolúveis do extrato bacteriano foram primeiramente solubilizadas em uréia e subsequentemente purificadas em coluna de afinidade Hi-trap Chelating utilizando-se cromatografia em FPLC (ÄKTA prime plus) para o da LaRPA Δ Obfold-1 LaRPA Δ Cterm, LaRPA Δ Obfold-1-2. Após as purificações terem sido realizadas com sucesso, ensaios de Western Blot foram realizados para verificar se os mutantes construídos eram reconhecidos pelo soro anti-LaRPA-1. A estrutura secundária dos três mutantes foi analisada por Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD), que mostra que as proteínas encontram-se enoveladas e prontas para serem utilizadas em ensaios de interação, tanto com DNA como com proteínas parceiras. Com o auxílio da bioinformática, um modelo estrutural teórico preliminar foi construído, sugerindo a presença de três domínios na LaRPA-1, dois domínios do tipo OB fold na região N-terminal e um domínio RFA-1 na região C-terminal da proteína RPA-1. Estes achados com certeza aumentam nosso conhecimento sobre a LaRPA-1 e podem significar avanços no entendimento de sua função nas maquinarias de replicação telomérica e convencional do parasita.

2. Introdução

2.1 *Leishmania* spp. e Leishmaniose

A leishmaniose é um conjunto heterogêneo de doenças não contagiosas causada por protozoários da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, gênero *Leishmania*. Uma característica importante desses parasitas, o que inclui os do gênero *Leishmania*, é a presença de uma única mitocôndria denominada cinetoplasto. Esta organela possui características bastante peculiares, apresentando morfologia fusiforme e sendo rica em DNA mitocondrial (kDNA) organizado na forma de maxicírculos e minicírculos (SIMPSON, 1987).

Para completar seu ciclo de vida, esse protozoário necessita de dois hospedeiros, um invertebrado e um vertebrado. Como hospedeiros invertebrados são identificados, exclusivamente, fêmeas de insetos hematófagos (flebotomíneos), da família Psychodidae e gênero *Lutzomyia* (conhecidos como mosquito palha no Brasil). A transmissão para os hospedeiros vertebrados ocorre através da picada do inseto infectado, no momento da hematofagia (NEVES, et al. 2005). Entre os hospedeiros vertebrados estão grandes mamíferos como roedores, canídeos e humanos. Ao menos 20 espécies pertencentes ao gênero *Leishmania* são patogênicas para o homem.

A doença tem epidemiologia mundial ampla, sendo mais comum em regiões tropicais. Estimativas indicam que essa doença aflige 12 milhões de pessoas, com 350 milhões de indivíduos em situação de risco. A ocorrência de 2 milhões de novos casos e 70.000 mortes por ano evidenciam a importância epidemiológica desta zoonose, e a ocorrência endêmica em 88 países, dos quais 16 são desenvolvidos e 72 estão em desenvolvimento, demonstra uma relação entre fatores socioeconômicos e incidência desta parasitose (WHO, 2000).

De acordo com a FUNASA (Fundação Nacional de Saúde), desde 1980 a leishmaniose vem se espalhando por todas as regiões do Brasil. Políticas inadequadas de saúde e saneamento básico, além de uma urbanização descontrolada são fatores que favorecem o contato humano com os diferentes tipos de inseto-vetor (WHO, 1990; GENARO et al. 1990; ARIAS et al., 1996).

A doença em humanos pode se apresentar sob quatro formas clínicas, dependendo da espécie parasitaria e do sistema imune celular do paciente:

- Leishmaniose cutânea: provoca lesões na pele, principalmente no rosto, braços e pernas. Embora nesta forma haja uma tendência de cura espontânea, ela pode criar graves lesões e deixar cicatrizes permanentes. Após a recuperação ou tratamento bem sucedido, geralmente induz imunidade a re-infecção pela espécie de *Leishmania* que causou a doença.
- Leishmaniose cutânea-difusa: forma clínica de difícil tratamento, caracterizando-se pela presença de lesões difusas não-ulceradas por toda a pele que se assemelham a lepra e não curam espontaneamente. Esta forma está especialmente relacionada a uma deficiência do sistema imunológico do paciente.
- Leishmaniose cutâneo-mucosa: também conhecida por 'espundia' na América do Sul, é caracterizada por lesões destrutivas secundárias envolvendo mucosas e cartilagens. Causa graves lesões que podem desfigurar o rosto do paciente, destruindo as membranas mucosas do nariz, boca e garganta.
- Leishmaniose visceral: conhecida também como 'calazar', e caracterizada por febre irregular, perda de peso, inchaço do fígado e do baço e anemia. É a forma mais grave da leishmaniose, e geralmente é fatal se não tratada. O período de incubação pode ser de meses ou anos e, ao contrário das formas cutâneas de leishmaniose, envolve os órgãos internos (WHO, 2000).

Outro ponto importante é que a leishmaniose é uma das infecções oportunistas que atingem indivíduos infectados pelo vírus HIV. O aparecimento do primeiro caso de co-infecção com o HIV em 1985 e a evolução da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida para uma situação de pandemia mudaram a história natural da leishmaniose devido à grande sobreposição epidemiológica das duas doenças. A co-infecção com o vírus HIV diminui a resposta a terapias e leva a aumentos nas probabilidades de relapso e de progresso para a forma visceral. Concomitantemente, a leishmaniose visceral acelera o progresso clínico do HIV já que ambas as doenças afetam as células do sistema imunológico (WHO, 2000).

A prevenção e um controle eficaz da leishmaniose apresentam dificuldades em todo o mundo, pois as medidas que são empregadas para a redução da transmissão, o controle dos

vetores e o tratamento farmacológico da infecção induzem o aparecimento de parasitas e vetores resistentes (JOHNSTON et al., 1999).

Vários medicamentos estão sendo usados há várias décadas, porém apresentam problemas de efeito colateral. Por estes motivos, a OMS tem incentivado o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento desta parasitose (KEDZIERSKI et al., 2006).

2.2 Ciclo de vida do parasita

As fêmeas de mosquitos flebotomíneos são artrópodos hematófagos que necessitam de proteínas do sangue para a oogênese (MORENO et al., 2010). No momento da picada, esses mosquitos podem ingerir parasitas sob formas morfológicas amastigotas (formato esférico e flagelo curto), que se transformarão em formas morfológicas promastigotas (formato fusiforme e flagelo longo) e irão se proliferar no intestino do inseto, fixando-se na parede intestinal, evitando assim sua expulsão. Neste ambiente, os promastigotas procíclicos diferenciam-se em promastigotas metacíclicos, cessam o processo de divisão celular e migram para as partes bucais do inseto, que as injeta no hospedeiro durante a hematofagia (BASU e RAY, 2005).

Após a infecção, ocorre a internalização do parasita através da endocitose mediada por receptores na superfície do macrófago e, logo em seguida, os promastigotas metacíclicos transformam-se rapidamente em formas amastigotas, capazes de se desenvolver e multiplicar no meio ácido encontrado no vacúolo digestivo (NEVES, 2005). O parasita utiliza várias estratégias anti-parasitárias, como a inibição da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS). Após uma intensa multiplicação, os parasitas provocam a lise celular e são liberados, voltando a infectar novas células do sistema de defesa (macrófagos).

O ciclo se completa quando um mosquito flebotomíneo não infectado alimenta-se do sangue de um hospedeiro infectado e as formas amastigotas voltam a se diferenciar em promastigotas no intestino do inseto (BASU & RAY, 2005; ALMEIDA, 2003; DE LANG et al., 2009; OLIVIER et al., 2005) (Figura 1).

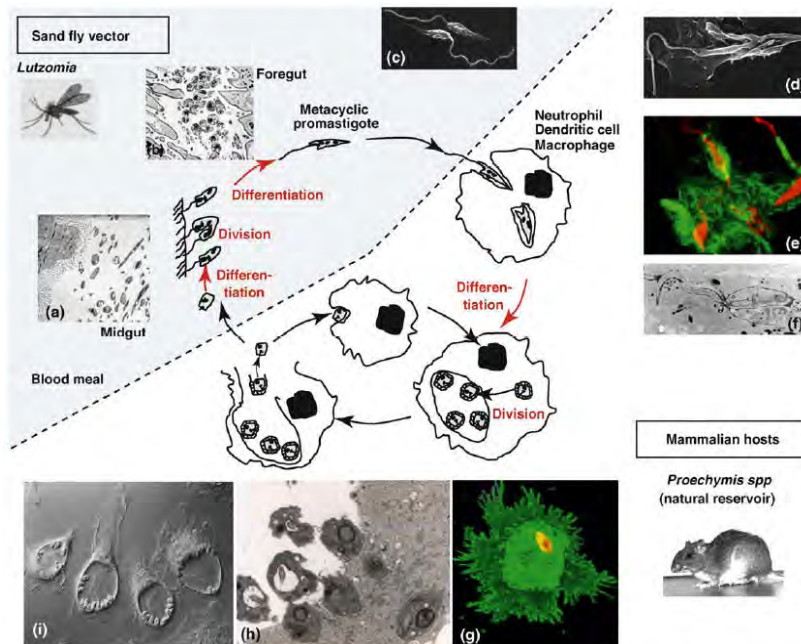


Figura 1. Ciclo de vida de *L. amazonensis*: imagens bi e tridimensionais de amostras fixadas no interior do inseto vetor (*Lutzomia*) e em reservatório natural (*Proechymis spp.*). (a) Promastigotas procíclicas no trato digestivo médio do inseto. (b) Promastigotas metacíclicas no trato digestivo anterior. (c) Promastigotas metacíclicas. (d,e,f,h,i) Macrófagos infectados. (g) Células dendríticas infectadas. (e,f) Promastigotas no fagossomo minutos após fagocitose. (f,h,i) Formação do vacúolo parasitário onde ocorre a transformação para formas amastigotas e proliferação do parasita. Figura adaptada de Lang e colaboradores (2009).

2.3 Biologia molecular de parasitas do gênero *Leishmania*

Os parasitas do gênero *Leishmania* são diplóides e possuem genoma diferente dos genomas típicos dos eucariotos, porém entre as espécies desse gênero os genomas são muito similares entre si e estão organizados em áreas centrais bem conservadas com polimorfismos concentrados nas extremidades dos cromossomos (STILES et al., 1999).

Seu genoma nuclear contém aproximadamente 70 Mb organizados em 34 a 36 cromossomos lineares que variam de tamanho entre 0,35 e 3,0 Mb. O número de genes é de 8-10 mil que podem estar presentes em cópias únicas, duplicados ou em múltiplas cópias repetidas em *tandem* (IVENS et al., 2005). A condensação cromossômica durante o ciclo mitótico não é observável, dificultando assim quaisquer tipos de análises citogenéticas (WINCKER et al., 1996; JOHNSTON et al., 1999; IVENS et al., 2005) reforçando a importância do estudo de sua biologia molecular.

Até o momento, não foram encontrados íntrons característicos de eucariotos superiores no genoma de parasitas do gênero *Leishmania*. Seus genes 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-Metilguanosina na extremidade 5' de RNAs em maturação e adição de cauda poli-A, gerando assim mRNAs maduros. Devido à ausência de promotores gênicos individuais típicos, estima-se que a regulação gênica em *Leishmania* ocorra principalmente em nível pós-transcricional (STILES et al., 1999). Recentemente foi demonstrado que sítios de transcrição policistrônicos estão localizados próximos a histonas H3 acetiladas, indicando que este processo possa ser um tipo geral de regulação da transcrição em *Leishmania major* (THOMAS et al., 2009).

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

Segundo PEACOCK e colaboradores (2007), ao comparar genomas de diferentes espécies de *Leishmanias*, o mesmo concluiu que poucos genes do parasita são importantes para determinar qual a forma clínica da leishmaniose será desenvolvida após a infecção e que talvez o genoma do infectado tenha um papel importante nas manifestações clínicas da doença.

2.4 Biologia molecular dos telômeros: Estrutura e função

A estabilidade do genoma e sua integridade são importantes para o funcionamento de um organismo e sua propagação, sendo que a região telomérica do genoma é a principal responsável por essa integridade (BLACKBURN, 2001). Telômeros são complexos DNA-proteína localizados na extremidade dos cromossomos eucarióticos e são responsáveis pela proteção destas extremidades contra degradação, recombinação e fusão com outros cromossomos, sendo importantes na estabilidade genômica. Esta 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).

O DNA telomérico é constituído por repetições 5'-TTAGGG-3' altamente conservadas em uma ampla gama evolucionária de organismos eucarióticos terminando com uma protrusão 3' de fita simples denominada "3' G-overhang". Esta protrusão serve como substrato para elongação dos telômeros pela enzima telomerase e subsequente síntese da fita complementar pela DNA polimerase α . A "3' G-overhang" também pode assumir conformações como *t-loops* (invasão da fita simples na fita dupla formando uma estrutura em laço) ou G-quadruplexes de fita simples ("G-quartet" ou G4 DNA) observadas em humanos, leveduras e *Trypanosoma brucei*, que protegem o DNA telomérico de ataques pela maquinaria enzimática de reparo ao DNA da célula e podem participar no controle do acesso da telomerase ao DNA telomérico (CHAN & BLACKBURN, 2004; GILSON & GELI, 2007; GRIFFITH et al., 1999; MUNOZ-JORDAN et al., 2001; SMOGORZEWSKA & DE LANGE, 2004; TEIXEIRA & GILSON, 2005).

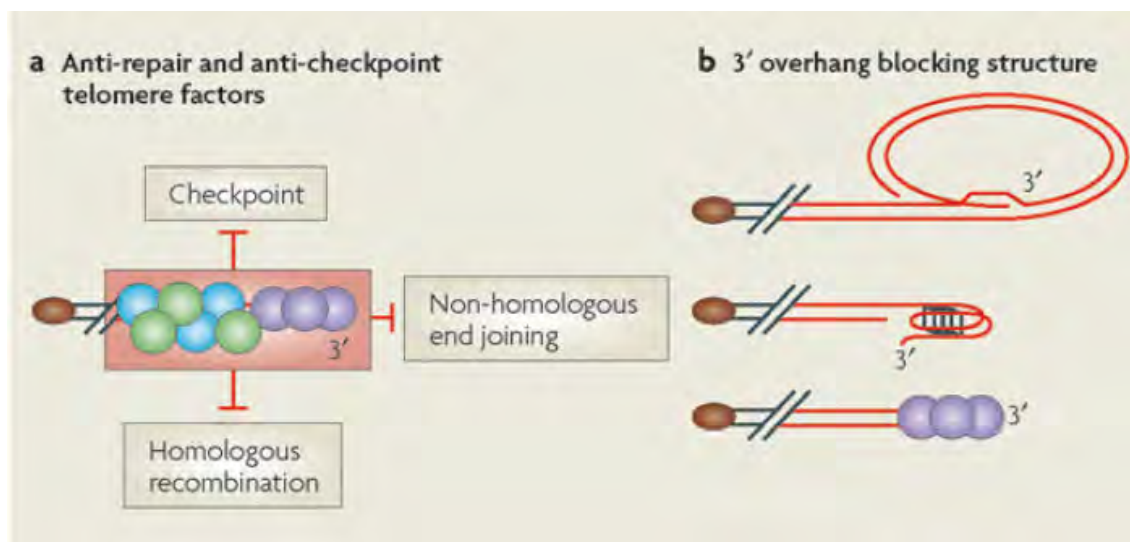


Figura 2. Estrutura telomérica (a) Os complexos de proteínas teloméricas protegem os telômeros da maquinaria de reparo do DNA. Em sua ausência eles seriam reconhecidos como quebras de dupla-fita e ativariam proteínas de verificação do ciclo celular bem como processos de junção de terminais cromossômicos através de recombinação homóloga e não homóloga. (b) O DNA telomérico pode assumir conformações alternativas como *t-loops* e G-quadruplexes que podem exercer papéis na proteção dos telômeros contra a maquinaria de reparo celular. Figura adaptada de Gilson e Geli (GILSON & GELI, 2007).

Tanto a dupla-fita como a simples-fita contendo as repetições teloméricas funcionam como sítios de interação para complexos protéicos responsáveis pela estabilidade do telômero, que variam em complexidade em diferentes organismos podendo até mesmo ocorrer envolvimento de

nucleossomos como observado em mamíferos (DMITRIEV et al., 2003; LIRA et al., 2007b). Algumas proteínas teloméricas também são responsáveis por regular o acesso da telomerase (AUBERT e LANSDORP, 2008).

Estes complexos protéicos são dinâmicos, podendo variar de acordo com o ciclo celular, idade da célula e estímulos externos (STEWART e WEINBERG, 2002; SMOGORZEWSKA e DE LANGE, 2004)

2.5 Complexo telomérico em *Leishmania amazonensis*

Foi identificado em *Leishmania amazonensis* a existência de três complexos protéicos que se associam *in vitro* a simples fita do DNA telomérico rico em G (FERNANDEZ et al., 2004). Em nosso laboratório, identificamos também a existência de duas proteínas que compõe dois desses complexos através de métodos bioquímicos (CANO et al., 1999). São elas LaRBP38 (*Leishmania amazonensis* RNA binding protein 38) e a proteína cujos mutantes truncados serão amplificados e clonados neste trabalho, a LaRPA-1 (*Leishmania amazonensis* Replication Protein A-1) (FERNANDEZ et al., 2004). A LaRBP38 e LaRPA-1 interagem e co-localizam com os telômeros do parasita *in vivo* (LIRA et al., 2007, SIQUEIRA-NETO et al., 2007).

Proteínas que se associam com a dupla fita do DNA telomérico também foram identificadas: 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)



Figura 3. Panorama atual dos telômeros de *Leishmania*. O DNA telomérico é composto por uma porção dupla-fita, formado pela repetição TTAGGG em tandem, seqüências subteloéricas (LCTAS - *Leishmania* Conserved Telomere Associated Sequences) e uma protrusão 3'G-overhang. As formas coloridas representam as 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 o modelo reverso da seqüência telomérica (Figura: DA SILVA, 2010 - dados não publicados).

2.6 A Proteína RPA e suas funções nos telômeros

A RPA (Replication Protein A) é uma proteína que se liga ao DNA simples fita e é conservada evolutivamente nos eucariotos. É trimérica, subdividida em RPA-1, RPA-2 e RPA-3 (figura 4), e foi inicialmente identificada como uma proteína importante para o processo de replicação do vírus simian 40 (SV40) (WOLD & KELLY, 1988, STILLMAN et al., 1992).

A proteína RPA apresenta múltiplas funções no metabolismo do DNA, participando das maquinarias de replicação, reparo, recombinação, “checkpoints”, transcrição e manutenção dos telômeros (LONGHESE et al., 1994, WOLD, 1997, SMITH et al., 2000). No reparo, a RPA participa de 4 grandes vias: reparo por excisão do DNA (NER), reparo por excisão de base (BER), reparo por DNA mal pareado (MMR) e reparo na quebra da dupla-fita (DSB) (WOLD, 1997).

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

A maior subunidade da proteína RPA, é a RPA-1 (ou RPA70, de acordo com seu tamanho em kiloDaltons) e contém 4 domínios OB-fold: RPA1-70N, RPA1-A, RPA1-B e RPA1-C. O domínio RPA1-70N estimula a atividade da DNA polimerase alfa, interage com diversos ativadores de transcrição, incluindo o supressor de tumor p53 e ainda interage com proteínas das maquinarias de “checkpoint” de dano ao DNA durante o ciclo celular (JACOBS et al., 1999)

A proteína RPA-1 apresenta também funções essenciais na manutenção dos telômeros de vários eucariotos (SMITH et al., 2000, SCHRAMKE et al., 2004, KIBE et al., 2007, KOBAYASHI et al., 2010), entre elas o recrutamento da telomerase. Em leveduras, esta habilidade é mediada por sua interação com a proteína Est1 que, junto a RPA, recrutam a telomerase para os telômeros na fase S do ciclo celular (SCHRAMKE et al., 2004).

A proteína RPA é ainda capaz de estimular a atividade de helicases de WRN (Werner syndrome) e BLM (Bloom syndrome), encontradas em complexos que promovem a desnaturação da dupla-fita de DNA em regiões longas de dupla-fita telomérica previamente

ligadas à TRF2 *in vivo* (OPRESKO et al., 2002), sugerindo que todas estas proteínas atuam em uma mesma via nos terminais cromossômicos.

Recentemente foi demonstrado em leveduras e humanos a existência de um complexo denominado CST (Cdc13, Stn1 e Ten 1) e várias evidências suportam a hipótese de que esse complexo forme uma versão do complexo da RPA (GAO et al. 2007, SUN et al. 2009). Junto com o complexo shelterin (complexo de proteínas com características específicas que interage com o DNA telomérico e ajuda na sua defesa, shelter = escudo), as CST são responsáveis pela manutenção e estabilidade telomérica. Deixando claro assim a importância do complexo RPA (MIYAKE et al., 2009; SUN, et al., 2009; WELLINGER, 2009).

Em *Leishmania*, embora a sequência gênica das outras subunidades estejam presentes no genoma, apenas LaRPA-1 é encontrada ligando sequência telomérica, podendo realizar funções exclusivas nos terminais cromossômicos em relação a RPA de outros eucariotos. Além disso, no genoma de *Leishmania* não existem homólogos das proteínas teloméricas Cdc13 e POT1 (proteína de proteção aos telômeros), sugerindo que a LaRPA-1 possa exercer a função destas proteínas nos terminais dos cromossomos de tripanosomatídeos.

A subunidade 1 das RPA de *Leishmania* (LaRPA-1, GenBank Acc. AY493356) foi identificada 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, passando a ser denominada LaRPA-1 (FERNANDEZ et al., 2004). Ela interage e co-localiza *in vitro* e *in vivo* com os telômeros do parasita. Apesar de compartilhar características estruturais com as RPA de outros eucariotos, as RPA-1 de vários protozoários, incluindo as de *Leishmania*, não possuem o domínio RPA-70 N de interação com proteínas da maquinaria de recombinação, mas apresentam o domínio OB-fold de ligação ao DNA (SIQUEIRA-NETO et al., 2007).

Os três mutantes que serão expressos irão conter deleções de partes do gene da LaRPA-1 são eles: LaRPA Δ Obfold-1 (proteína sem o domínio de interação ao DNA, o domínio OB fold 1, localizado na extremidade N-terminal), LaRPA Δ Cterm (região que inclui os 2 domínios OB fold da região N-terminal) e LaRPA Δ Obfold-1-2 (região que não apresenta nenhum domínio conhecido de ligação a ácidos nucleicos).

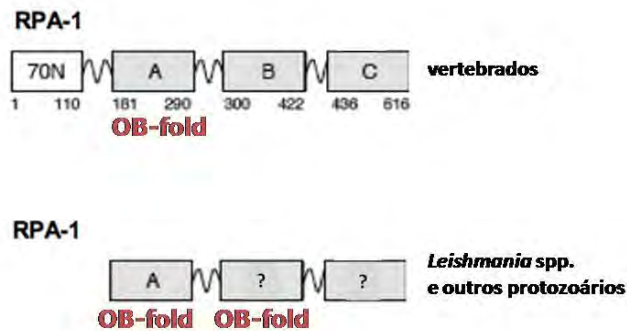


Figura 4. Comparação da estrutura primária das subunidade 1 da proteína RPA de vertebrados e de *Leishmania* e outros protozoários. Em humanos existem 4 domínios de interação ao DNA do tipo OB fold, já em *Leishmania* existem 2 domínios de interação ao DNA do tipo OB fold, sendo que a função de um deles é desconhecida. Figura reformulada a partir de Bochkarev & Bochkareva (2004),

3. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo clonar os genes e expressar e purificar as proteínas recombinantes de três diferentes mutantes truncados da proteína LaRPA-1, bem como analisar seu enovelamento através de dicroísmo circular. O intuito do projeto é o de futuramente, utilizar as proteínas recombinantes para mapear possíveis domínios de interação com outras proteínas na LaRPA-1. Assim, as proteínas recombinantes aqui produzidas serão utilizadas como ligantes em ensaios de captura do tipo “pull-down”.

4. Metodologia

4.1 Cultura de parasitas

Promastigotas originados de cultura axênica em fase exponencial de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*, cepa MHOM/BR/73/M2269 serão cultivados a 27°C em meio 199 (Cultilab) pH 6.5, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e 1X solução de Antibiótico (penicilina e estreptomicina)/Antimicótico (Anfotericina B) (Life Technologies, Gibco-BRL).

4.2 Extração de DNA genômico

DNA genômico foi extraído de promastigotas em fase exponencial de crescimento. As células foram ressuspensas em solução de lise (TELT: 10mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM EDTA pH 8.0, 100mM cloreto de lítio e 0.1% Triton X-100). Os ácidos nucleicos foram extraídos 2-3 vezes com

fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), precipitados em solução de etanol 100% (Merck) na presença de 0,3M de acetato de sódio pH 5,2 e ressuspensos em 1X TE (Tris-HCl 10mM pH 7,5; 1mM EDTA pH 8,0) para serem tratados com 10g de RNase A por 15 minutos a 37°C. A qualidade das extrações e a concentração de DNA em cada amostra foram estimadas através de corridas eletroforéticas em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5g/ml) em 0,5X TAE (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA) ou dosagem das amostras em espectrofotômetro com luz U.V. (OD_{260nm}) (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

4.3 Amplificação e clonagem dos mutantes de LaRPA-1

O gene que codifica LaRPA-1 já encontrava-se clonado e sequenciado no laboratório (no acesso do genBank CAJ05550). Versões truncadas da proteína LaRPA-1 foram construídas e clonadas em sistema bacteriano pET-28a(+)(Novagen) para expressão de proteína recombinante com cauda de Histidina com o par de iniciadores RPA-pET-F e RPA-pET-R (tabela 1). As versões truncadas serão: LaRPA Δ Obfold-1, LaRPA Δ Cterm e LaRPA Δ Obfold-1-2.

A amplificação desses fragmentos foi feita por PCR utilizando-se DNA genômico de *L. amazonensis* como molde. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose e corados com brometo de etídeo. 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, realizamos extrações de DNAs plasmidiais em pequena escala (PerfectprepR, Plasmid Mini - Eppendorf) para subsequente subclonagem no vetor de expressão.

Para amplificação dos mutantes em *L. amazonensis*, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1) com base na sequência homóloga de *L. major*. Como molde, utilizamos DNA genômico e cDNA de *L. amazonensis*. Para a construção do cDNA, foram utilizados mRNA poli (A)+ e a enzima SuperScript II RT (“SuperScript™ Choice System for cDNA Synthesis” da Life Technologies). Para a reação de amplificação por PCR foram utilizados 100ng de DNA genômico

e 10ng de cDNA de *L. amazonensis*, aos quais foram adicionados 1X tampão da enzima Platinum Taq (Invitrogen), 1mM de dNTPs, 1mM MgCl₂, 5pmols de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 10% DMSO e 1U de Platinum Taq DNA polimerase.

Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídio, purificados em gel (“Perfectprep Gel Cleanup Kit”, Eppendorf) e seqüenciados (“Kit Big Dye Terminator v 3.0”, Applied Biosystems) utilizando-se os mesmos iniciadores desenhados para a amplificação. Confirmada a seqüência (utilizando-se os programas “Gene Runner” e BLAST, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), os produtos obtidos foram clonados no vetor “TOPO TA Cloning – pCR 2.1 TOPO” (Invitrogen). Bactérias *Escherichia coli* DH5α competentes foram transformadas com o vetor e plaqueadas na presença de 100µg/ml de ampicilina, 0,004% X-Gal e 0,007% IPTG (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Foram realizadas mini-preparações dos plasmídeos utilizando-se o Kit Perfectprep® Plasmid Mini (Eppendorf). Plasmídeos recombinantes foram seqüenciados utilizando-se os iniciadores do vetor: M13 F (senso) e M13 R (antisenso) para confirmar a clonagem.

Tabela 1: Seqüência dos oligonucleotídeos que serão utilizados nas clonagens

Nota: Senso (F) e anti-senso(R)

Oligonucleotídeo	Seqüência
RPA-pET-F	5' CAT ATG CAG CAG CCA G 3'
RPA-pET-R	5' CTC GAG TCA GAC GTA AGC 3'
RPA-ΔOBf-1-F	5' CAT ATG CTG GCG CGG CAG 3'
RPA-Nt-pET_R	5' CTC GAG GAC GAC AAG GAC A 3'
RPA-Ct-pET_F	5' CTC GAG GAC GAC AAG GAC A 3'

4.4 Subclonagem dos fragmentos de DNA contendo os mutantes de LaRPA-1 no vetor de expressão pET 28 a+

Para a subclonagem em vetor pET 28 a+, os DNAs plasmidiais e o vetor pET 28 a+ foram digeridos com 2 enzimas de restrição, respectivamente *Nde*I e *Xho*I. Para tal, 20ng de DNA

Os produtos de ligação foram transformados em bactérias competentes *E. coli* DH5 α e plaqueados em LB solido suplementado com 50 μ g de Kanamicina já que o vetor apresenta resistência a essa droga. Para verificar o sucesso da clonagen algumas colônias foram selecionadas e submetidas a PCR e posteriormente foi feita a extração do DNA plasmidial através do Kit PerfectprepR, Plasmid Mini - Eppendorf.

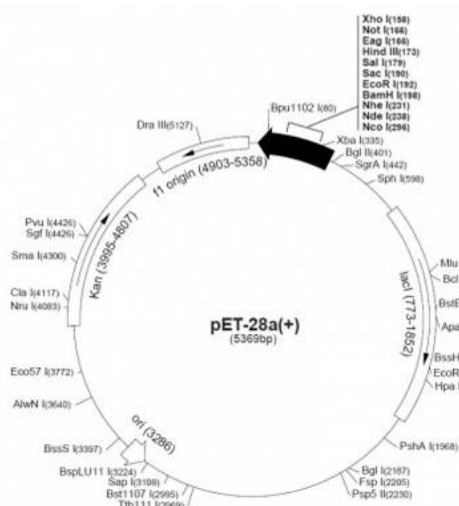


Figura 5. Mapa do vetor de expressão pET-28a(+) - este vetor contém origem de replicação bacteriana (ori), gene que confere resistência a kanamicina (Kan), promotor T7lac (promotor T7 fundido ao operador do gene lac), possibilitando a indução da expressão da proteína recombinante por IPTG, e uma origem f1, para mutagênese e sequenciamento.

4.5 Produção e purificação das proteínas recombinantes

Após a subclonagem, os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar bactérias competentes DH5 α . Esses transformantes foram plaqueados em Meio LB sólido, contendo 50 μ g/ml de Kanamicina. Para os ensaios de expressão, esses recombinantes foram utilizados para transformar bactérias competentes BL21 DE3 RP 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.

Foram realizados ensaios preliminares de expressão em pequena escala (100 ml de cultura) para observação do momento em que a bactéria expressa melhor a proteína recombinante (Mini-indução).

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 pela quantidade de horas observada na mini-indução.

Em seguida, as células foram submetidas a centrifugação a 7000rpm 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 (200 μ g/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 13000rpm 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 serão desnaturadas na presença de 7M de uréia (concentração final).

Para a purificação das proteínas insolúveis (LaRPA Δ Obfold-1, LaRPA Δ Cterm e LaRPA Δ Obfold-1-2), elas 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 (AKTAprime plus).

As frações da coluna que continham as proteínas foram visualizadas em gel 15% SDS-PAGE corado com Coomassie e os eluatos serão agrupados e dialisados *overnight* em tampão glicina 50 mM PH8,0 para garantir que toda uréia, sal e imidazol sejam eliminados da mistura. Em seguida, essas amostras estavam precipitadas e foram separadas do sobrenadante por centrifugação a 13.000 rpm/15 min/4°C.

Em seguida, os precipitados contendo as proteínas foram ressolubilizados em tampão glicina 50 mM PH8,0 e uréia 7M final. A heparina serve como um aditivo do tipo chaperona artificial, para permitir o perfeito renovelamento das proteínas (LIRA et al. 2007). 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 restem precipitados visíveis na mistura, o que é um indicativo de que a proteína está renaturada e assim pronta para ser utilizada.

4.6 Análise da expressão dos mutantes da proteína LaRPA utilizando-se “Western-blot”

Extratos protéicos brutos de *L. amazonensis* e dos mutantes da proteína LaRPA foram aplicados em géis de SDS-PAGE e transferidos para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) em 1 X tampão de transferência (48 mM Tris-Base, 39 mM glicina, 20% metanol, 0.0375% SDS) por 16 h a 4°C utilizando o aparato Trans-Blot Cell (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). A detecção das proteínas foi realizada utilizando-se anticorpo específico anti-LaRPA-1 (SIQUEIRA NETO et al., 2007) e anti-HisTag e o kit “Immobilon Western – Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore).

4.7 Ensaio de Dicroísmo Circular

O ensaio de Dicroísmo Circular (CD) foi executado utilizando-se o equipamento Jasco J-815 e o software Spectra Manager™ II, CDPPro program package (SREERAMA & WOODY, 2000). Medidas foram feitas utilizando-se cubeta de quartzo de 0,5mm e os seguintes parâmetros: *scanning speed* 100 nm/min; *band width* 2nm; *step resolution* 0.5nm, *temperature* 20°C.

O espectro corresponde à média de 20 acumulações de todos os espectros foram coletados no intervalo de 190-260nm. Todas as amostras foram analisadas na presença de fluxo de N₂ para que O₂ presente no ar não interferisse na leitura dos dados dentro do equipamento. A concentração de proteína utilizada foi de 260 µg.ml⁻¹ para todas as medidas. As proteínas estavam armazenadas em tampão contendo 20 mM cloreto de sódio e 20 mM glicina. O tampão foi utilizado como branco.

Os espectros de CD foram analisados em termos de estrutura secundária utilizando-se o algoritmo Continl (SREERAMA & WOODY, 2000) disponível no programa de pacotes para deconvolução de curvas de CD, CDPPro (SREERAMA & WOODY, 2000). Além disso, a quantidade de alfa hélices também foi estimada usando-se a equação proposta por MORRISET *et al.* (1973).

A unidade utilizada para os espectros de CD foi a MRE (*Mean Residue Ellipticity/degrees cm²dmol⁻¹residue⁻¹*) que é uma das mais utilizadas.

5. Resultados e Discussão

5.1 Amplificação dos fragmentos dos 3 mutantes por PCR

O gene que codifica LaRPA-1 já encontrava-se clonado e sequenciado no laboratório (no acesso no GenBank CAJ05550). Os mutantes truncados foram construídos e amplificados por PCR utilizando-se os seguintes iniciadores baseados na sequência de nucleotídeos do gene *LaRPA-1*. Para melhor visualização das regiões deletérias, ver figura 6.

1ATGCAGCAGCCAGGCAGCCACCAGATCCAGCCCATCGACTCCCTCACACCGTT
TCTCGGCGGCAAGTGGTGGATTCGGGCCCCGTGTGACGGACAAGACGGACGTCCGTACC
TGGAACAAGCCGACGTCGCAGGGAAAGCTCTTCTCCTTTACCCTCATTGACGAGTCGG
CCGCGATTCGGGCAACGGTTTTCAATGACGCCGTGACACCTTCGAGCCGCTCATCGTC
AACGGACAGGTGTACTACTTCAGCGGTGGCCAGGTGAAGAATGCGAACC GGCGTTTCA
GCAACGTGAACAACGACTACGAGCTCACGTTTGACCGCAGCTCGGAGATTATGCTGGC
GCGGCAGGACACATCGACAGCGGCGCTGCCGATGCAGCGCTACAACCTTTGTGCCGATC
GAACTTCTGAAGCAGCGCGAGGTCGGCTCGCTCGTCGATGTGCTCGGCGTTGTGCTCA
AGGTAGACGAAGTGTCGTCCATCACGAAAAGTCGACTGGCCGCGAGCTCGTGAAGCG
AAACGTCAAGATGGGTGACATGACGGCGGCTGTGGAGGTCACCTTTTGGAATGACGAG
GCAAAGGCGTGGTGCTACCCGGTCGGCACCGTTGTGGCGCTGCGGCAGCTGAAGGTCG
GCAGTTTCCACGGTGTACCTTCTCATCCACCTATCAGACTAAGATTGACATCAACCCG
ACAGACCTGCCGGATGTCAAGAACTCGCAACGTGGTATGTGACGACTGGCGGCGCGA
ATGTGATGTCCTTGTCGTCGCAGGGGCTTGCGCGGCGAGCGGGGCCGGTGGCGAGAG
CGACCGCGGCCGCAAGTATCTGGACGAGATCCAGTCGGATGGGATCGGCCGGGGCCTG
AAGCCCGAGTACGTGACGTCCGATGCGTCCCGATTTACTTCAAGCAGGACGCCAGT
GGTACGACGCGTGCCCGACCTGCAATAAAAAGGTGACCGAGGAGGGTGCGCAGGGCG

ACCGCTTTCGCTGCGAGAAGTGCGACAAGACCGTCACGCCGACGCAGCGCTATCTTGT
 CTCCATCCAGGTCACGGACAACGTCTCTCAGGCGTGGCTAACGCTCTTCAACGAAGCC
 GGCATCGAGTTCTTTGGGATGGAGGCGGCAGAGCTGAAACGTCGTGCGCAGGAGGACC
 CTCTCTACATCGCGAAACTGGCCCAGGGCCGCATGAACCGACCAGTGGTGATGCGTCT
 GCGCGTGAAGGAGGAGACGAGCTCGAACGCCATGACCGGCGAGGAGTCAGACCGGCT
 GCGCATGTCAAGTGGTGCGCATCTCCGAGTTCATGCCGATTGCGGGCACCTCCGAGGAG
 ACGCGTCGCCGCCTCGCGCAGAACCTGCGCACAGAGTGCGATGAAATTCTCCGCCTCA
 TCGAG **GCTTACGTCTGA** 1404

Figura 6. Sequência de nucleotídeos do gene que codifica a proteína LaRPA, as cores simbolizam a sequência de nucleotídeos usadas para desenhar os iniciadores mostrados na tabela 2.

Tabela 2: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores elaborados para construção dos mutantes

RPA-pET-F	5' <u>CAT</u> ATG CAG CAG CCA G 3'
RPA-pET-R	5' <u>CTC GAG</u> TCA GAC GTA AGC 3'
RPA-ΔOBf-1-F	5' <u>CAT</u> ATG CTG GCG CGG CAG 3'
RPA-Nt-pET_R	5' <u>CTC GAG</u> GAC GAC AAG GAC A 3'
RPA-Ct-pET_F	5' <u>CTC</u> ATG TCC TTG TCG TC 3'

Obs: As cores correspondem as sequências de nucleotídeos ressaltadas na Fig. 6, e as sequências sublinhadas correspondem aos sítios para as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* que serão usadas para a clonagem direcionada dos insertos no vetor de expressão pET 28a+.

Para a clonagem dos mutantes foram utilizados as seguintes combinações de iniciadores (ver tabela 2):

LaRPA ΔObfold-1 (proteína de aproximadamente 41 kDa sem o domínio OB fold 1, mais próximo da extremidade N-terminal): iniciadores RPA-ΔObfold-pET-F e RPA-pET-R (1.068 bp)

LaRPA ΔCterm (proteína de aproximadamente 30 kDa, que inclui os 2 domínios OB fold da região N-terminal): iniciadores RPA-pET-F e RPA-Nt-pET_R (770 bp)

LaRPA Δ Obfold-1-2 (proteína de aproximadamente 26 kDa, que não apresenta nenhum domínio conhecido de ligação ácidos nucléicos), iniciadores: RPA-Ct-pET_F e RPA-pET-R (648 bp)

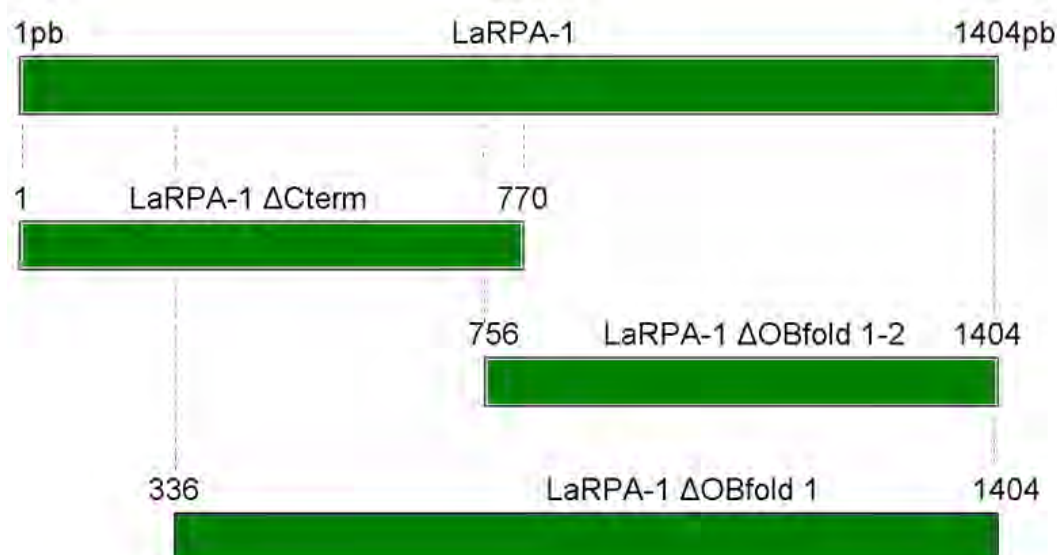


Figura 7. Diagrama esquemático mostrando a posição de cada um dos três mutantes truncados originados do gene *LaRPA-1*. Os números correspondem a posição do primeiro e último nucleotídeo usado para construir cada mutante.

Na figura 8 temos um gel de agarose mostrando os produtos de amplificação por PCR correspondentes a cada um dos 3 mutantes truncados, de acordo com o mostrado nas Figs 6 e 7. Estes produtos foram posteriormente purificados para clonagem em vetor TOPO (ver item a seguir).

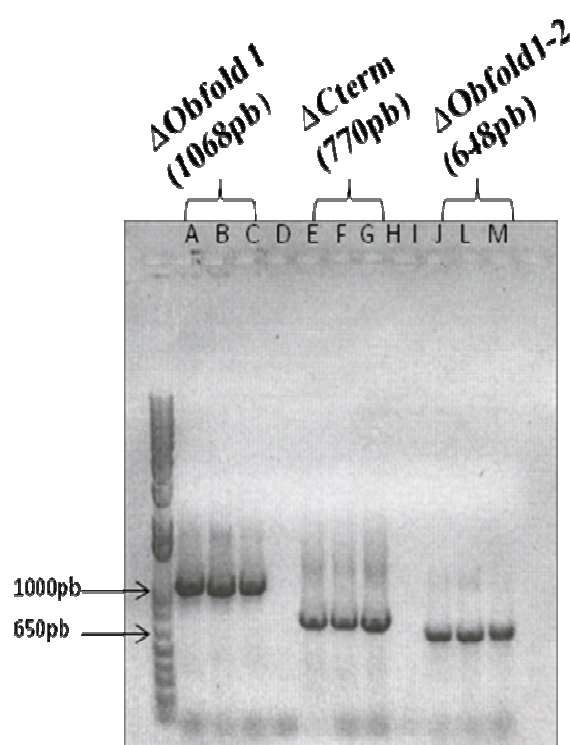
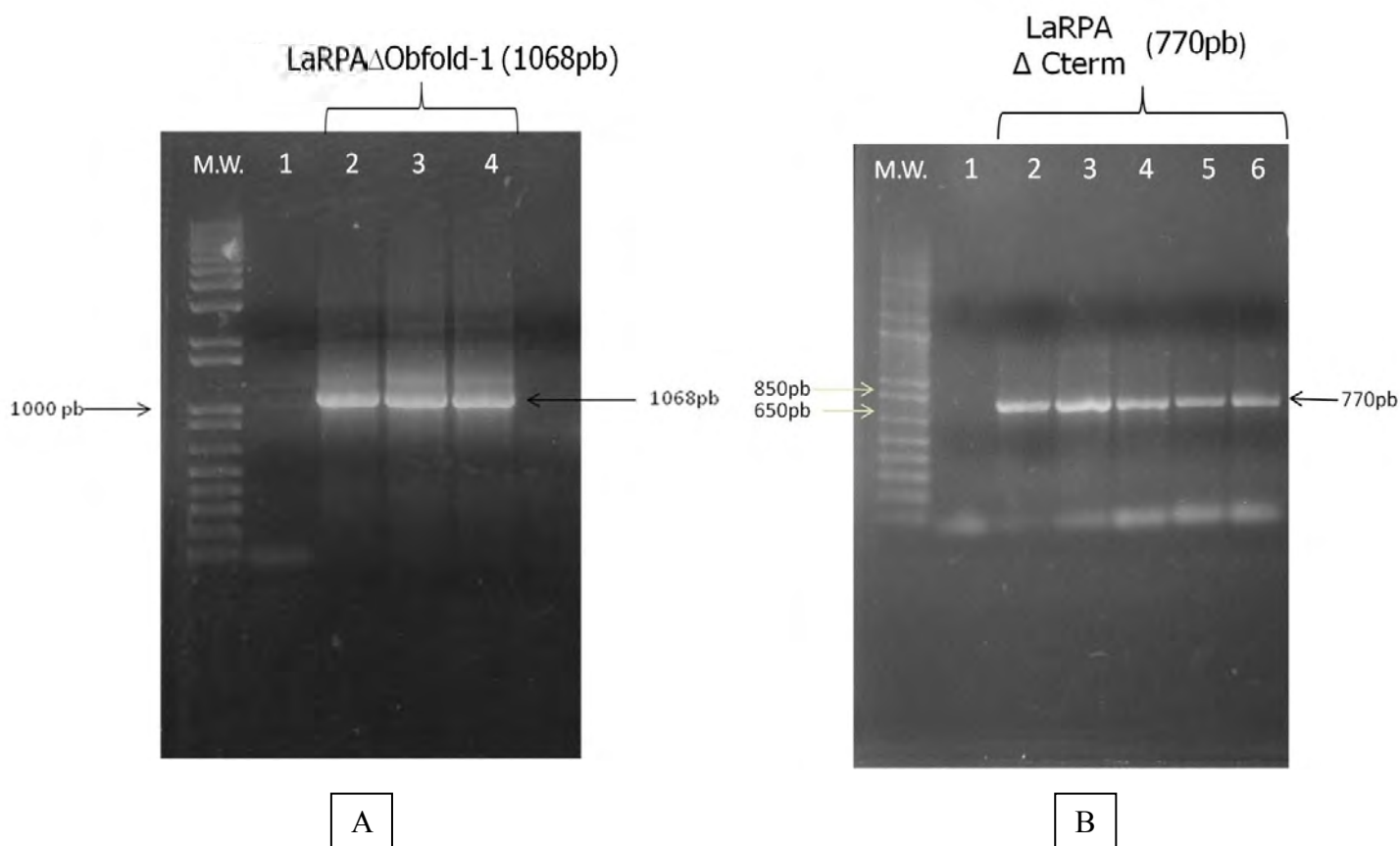


Figura 8. Amplificação genômica dos três mutantes truncados do gene *LaRPA-1*. Gel de agarose 0,8% em 0,5X TAE corado com brometo de etídeo, mostrando a amplificação por PCR dos 3 mutantes truncados da *LaRPA-1*. Nas linhas A, B, C temos o produto da reação de amplificação do mutante *LaRPA* Δ Obfold-1. Nas linhas E, F, G, amplificação dos produtos correspondentes ao mutante *LaRPA* Δ Cterm. Nas linhas J, L, M, amplificação dos produtos correspondentes ao mutante *LaRPA* Δ Obfold-1-2. As linhas D e I mostram o controle negativo da reação, onde a reação de amplificação foi realizada na ausência de DNA. O marcador molecular utilizado foi o 1 Kb Plus DNA Ladder que mostra o padrão de peso molecular.

5.2.1 Clonagem dos fragmentos gênicos correspondentes aos mutantes LaRPA Δ Obfold-1, LaRPA Δ Cterm e LaRPA Δ Obfold-1-2 no vetor TOPO.

De posse dos produtos amplificados (LaRPA Δ Obfold-1, LaRPA Δ Cterm e LaRPA Δ Obfold-1-2) obtidos por PCR, estes foram purificados utilizando-se kit de purificação de produto de PCR Wizard Purification Systems da Promega, quantificados utilizando-se espectrofotometria de luz U.V. (DO_{260nm}) e, em seguida, clonados em vetor de clonagem PCR 2.1 –TOPO, seguindo as especificações do fabricante. A figura 9 (A,B,C) apresenta três géis de agarose mostrando produto de amplificação por PCR dos insertos dos três mutantes clonados. Eles foram amplificados diretamente das colônias bacterianas recombinantes correspondentes as construções TOPO+ LaRPA Δ Obfold-1 (Fig.9, item 1), TOPO+ LaRPA Δ Cterm(Fig.9, item 2), TOPO+ LaRPA Δ Obfold-1-2 (Fig.9, item 3) demonstrando que as clonagens no vetor pCRR 2.1 – TOPO foram realizadas com sucesso.

Confirmadas as clonagens no vetor pCR 2.1 – TOPO, extrações de DNA plasmidial foram realizadas em pequena escala (Mini prep) para utilização e estocagem dos DNAs no vetor TOPO no Laboratório de Telômeros.



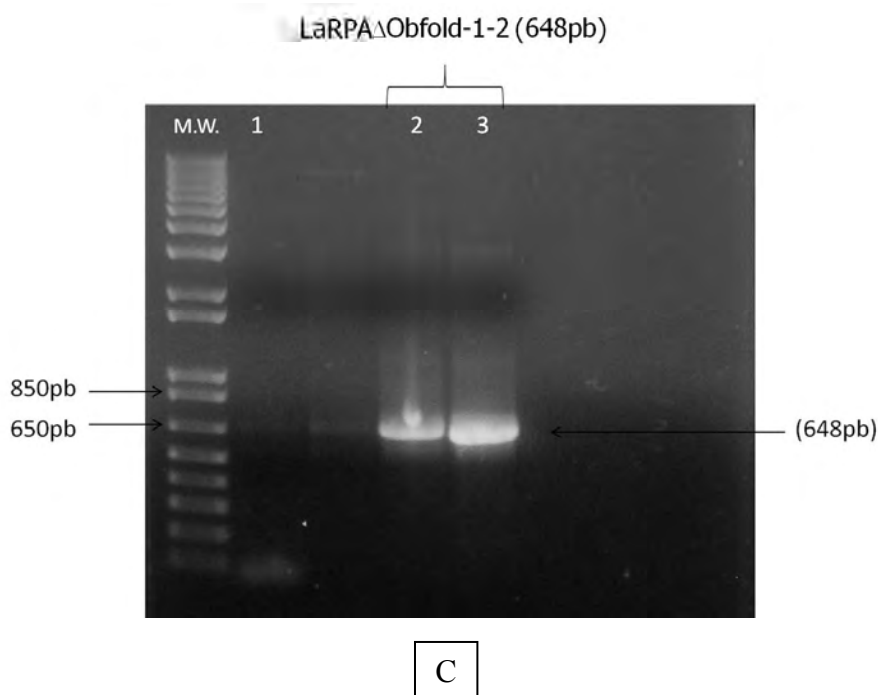


Figura 9. Confirmação da clonagem dos genes LaRPA Δ Obfold-1, LaRPA Δ Cterm e LaRPA Δ Obfold-1-2. Gel de agarose 0,8% em 0,5X TAE corado com brometo de etídeo apresentando produtos da amplificação dos insertos clonados dos genes LaRPA Δ Obfold-1, LaRPA Δ Cterm e LaRPA Δ Obfold-1-2 usando como molde colônias bacterianas recombinantes escolhidas aleatoriamente. Em A, produtos de amplificação do gene LaRPA Δ Obfold-1 (linhas 2,3,4). Em B, produtos de amplificação do gene LaRPA Δ Cterm (linhas 2,3,4,5,6). Em C, produtos de amplificação do gene LaRPA Δ Obfold-1-2 (linhas 2,3). Em A, B, C a linha 1 simboliza o controle negativo, que consiste na reação de amplificação na ausência de DNA. M.W. mostra o padrão de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

5.2.2. Subclonagem no vetor de expressão pET28a+.

A subclonagem dos genes LaRPA Δ Obfold-1, LaRPA Δ Cterm, LaRPA Δ Obfold-1-2 no vetor de expressão bacteriano (pET 28a+ - Novagen) permite a obtenção de proteína recombinante contendo uma cauda de 6X-Histidina na extremidade N-terminal a qual facilita o processo de purificação dessas proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade em colunas de níquel. Para a realização da subclonagem, os DNAs plasmidiais e o vetor pET 28a+ foram digeridos com duas enzimas de restrição, respectivamente *NdeI* e *XhoI*. Após a digestão de ambos DNAs, purificação e ligação do inserto no vetor (Material e Métodos), o produto das ligações foi usado para transformar bactérias *E. coli* DH5 α . Uma vez obtidos os clones recombinantes, outras mini preparações foram realizadas e os plasmídeos recombinantes foram usados para transformar bactérias competentes *E. coli* BL21, adequada para expressão heteróloga em sistema bacteriano.

A confirmação da subclonagem foi feita pela amplificação dos fragmentos de LaRPA Δ Obfold-1 (~1.068 pb), LaRPA Δ Cterm (~770 pb), LaRPA Δ Obfold-1-2 (~648 pb) utilizando os oligonucleotídeos desenhados na Tabela 1, como demonstrado na figura 10.

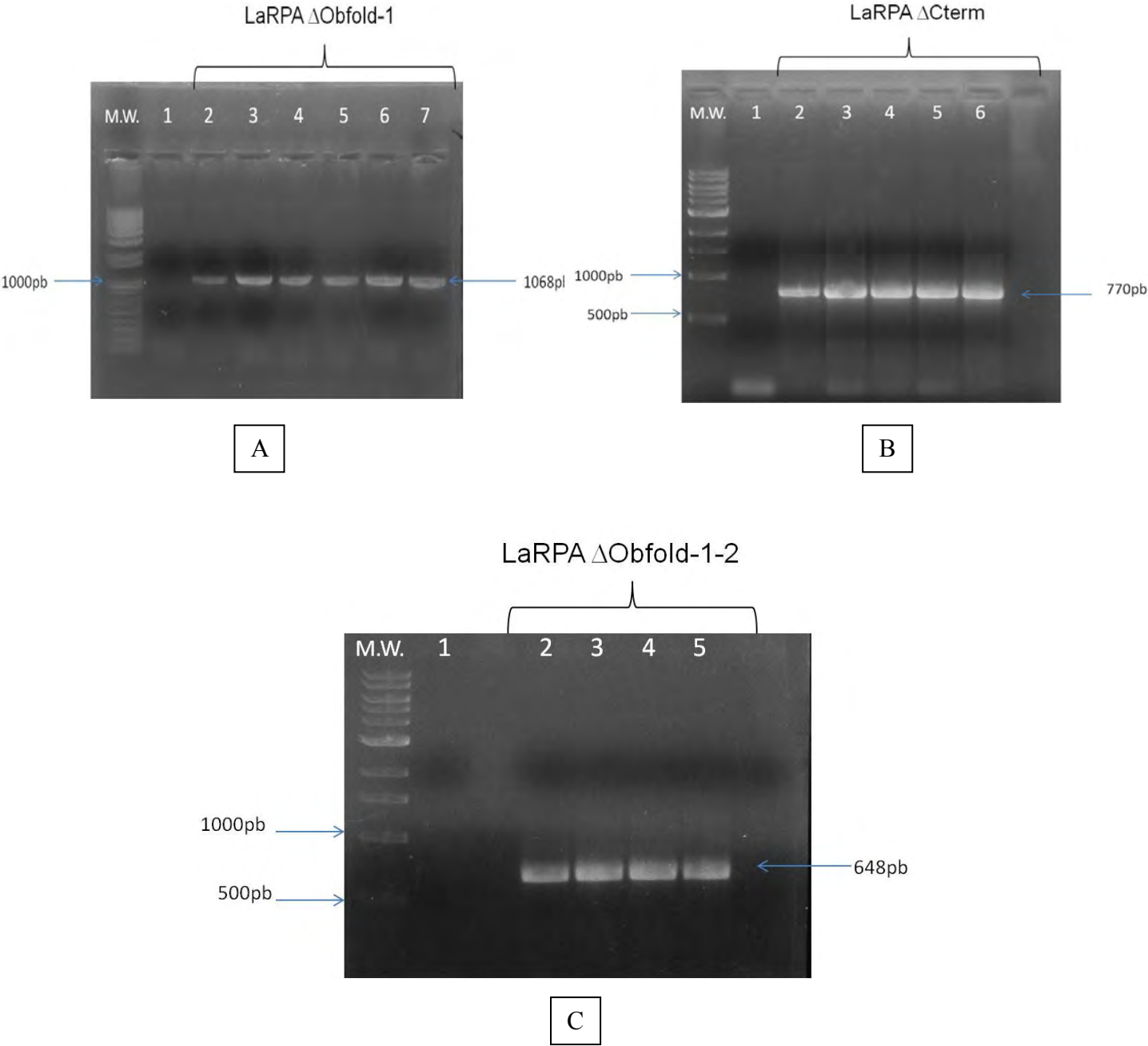
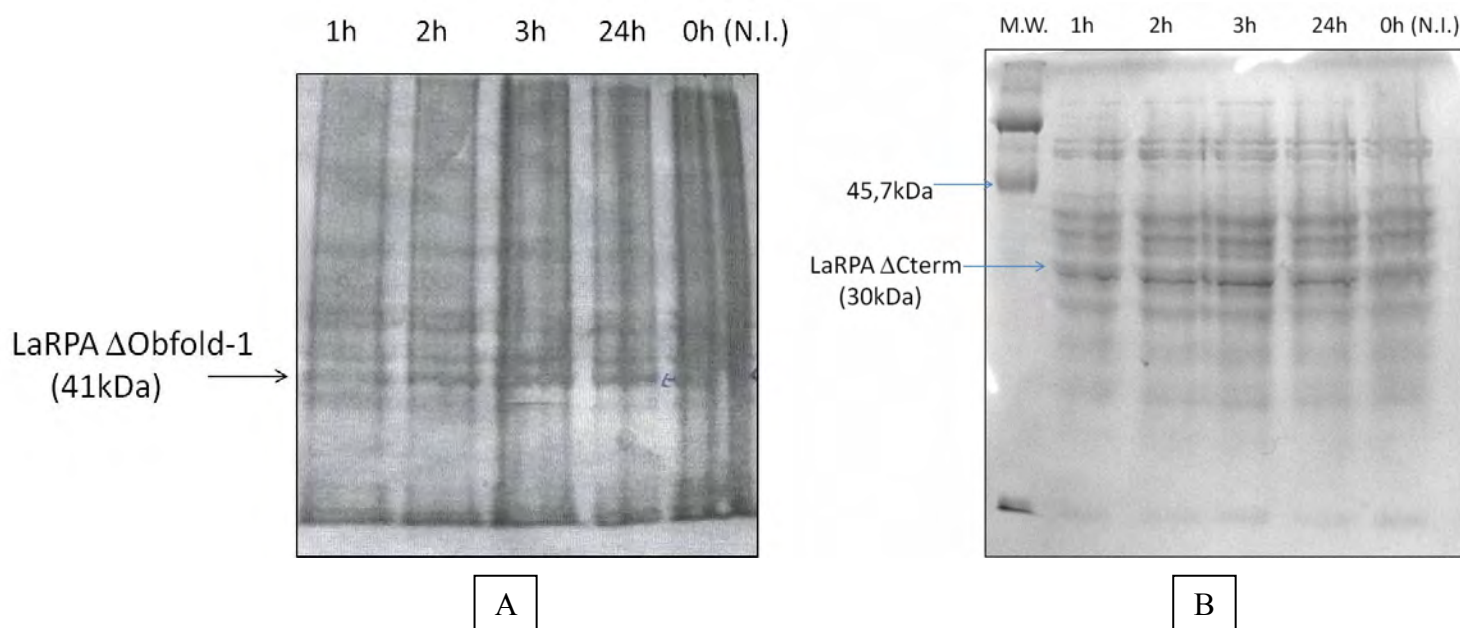
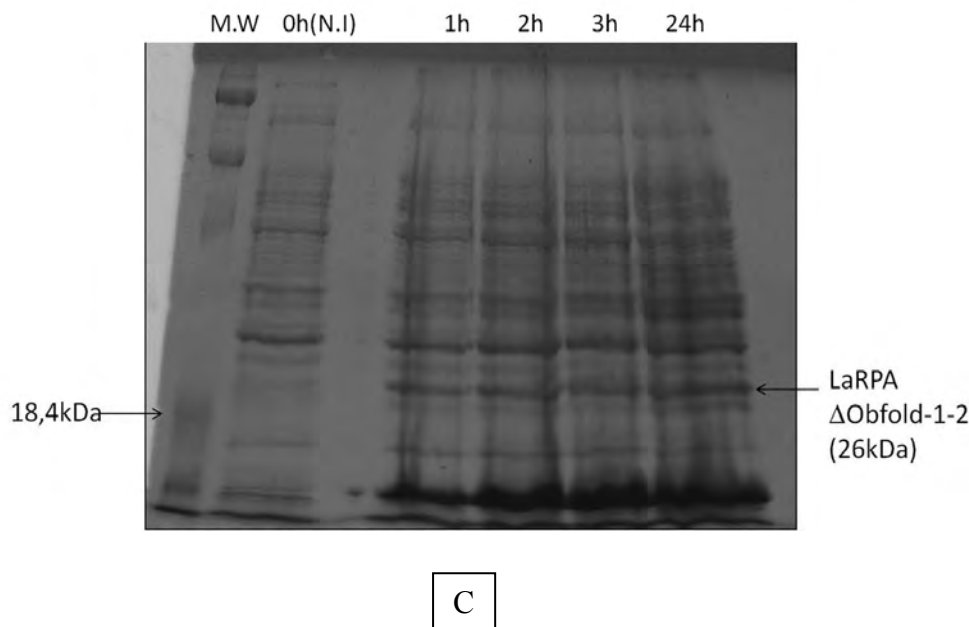


Figura 10. Confirmação da subclonagem dos genes LaRPA Δ Obfold-1, LaRPA Δ Cterm, LaRPA Δ Obfold-1-2. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo em 0,5X TAE apresentando produtos de amplificação por PCR a partir de colônias contendo a construção pET28a+ e os respectivos insertos de interesse, demonstrando que a clonagem no vetor de expressão pET28a+ foi realizada com sucesso. Em A, temos a reação de amplificação do gene LaRPA Δ Obfold-1 contido no vetor pET28a+ (linhas 2,3,4,5,6,7). Em B, a reação de amplificação do gene LaRPA Δ Cterm (linhas 2,3,4,5,6). Em C, a reação de amplificação do gene LaRPA Δ Obfold-1-2 (linhas 2,3,4,5). As diversas colônias de bactérias foram escolhidas aleatoriamente. Em A,B e C, a linha 1 mostra o controle negativo da reação, ou seja, a reação de amplificação foi realizada na ausência de DNA. Em A,B e C, M.W. mostra o padrão de peso molecular. Em A foi utilizado o marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), já em B e C, o marcador utilizado foi 1 Kb DNA Ladder (New England Biolabs).

5.2.3 Ensaio de mini indução de expressão das proteínas LaRPA Δ Obfold-1, LaRPA Δ Cterm e LaRPA Δ Obfold-1-2.

Foram realizados ensaios preliminares de expressão em pequena escala (100 ml de cultura), na presença de 1mM de IPTG, para observação do momento em que a bactéria expressa as proteínas recombinantes em maior quantidade (Mini-indução). Foram obtidos extratos bacterianos totais utilizando-se lise química e sonicação. 10 μ l de cada um dos extratos foram submetidos a fracionamento em gel 12% SDS-PAGE. Como mostrado na Fig. 11, as proteínas LaRPA Δ Obfold-1 (~41 kDa), LaRPA Δ Cterm (~30kDa), LaRPA Δ Obfold-1-2 (~26kDa) são expressas na primeira hora e assim continuam até 24h após a indução. Inclusive observou-se uma expressão basal da proteína no tempo zero. Foi escolhido o tempo de 3h após a indução para a expressão da proteína em larga escala.



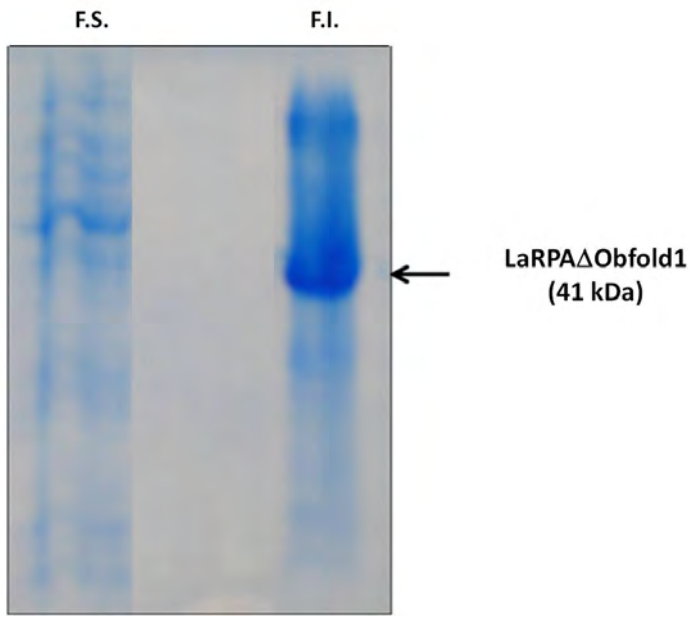


C

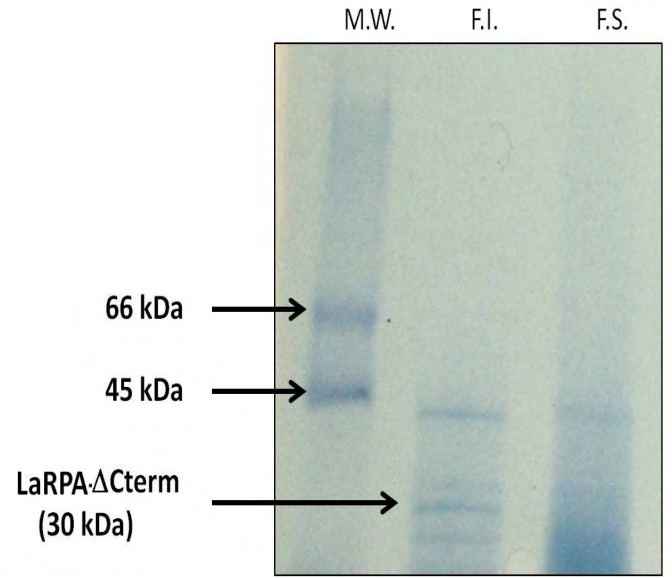
Figura 11. Estudo de expressão dos mutantes LaRPA Δ Obfold-1, LaRPA Δ Cterm, LaRPA Δ Obfold-1-2. Ensaio de expressão das três proteínas mutante em *E. coli* (BL21). Proteínas obtidas de extrato bacteriano foram fracionadas em gel 12% SDS-PAGE e coradas com Coomassie Blue. O tempo 0h indica a expressão basal, na ausência de 1 mM IPTG, representando o extrato não induzido (NI). Os géis mostram os tempos 1 hora, 2 horas, 3 horas e 24 horas após a indução. Em A, mini indução da proteína LaRPA Δ Obfold-1. Em B, mini indução da proteína LaRPA Δ Cterm. Em C, mini indução da proteína LaRPA Δ Obfold-1-2. O tempo escolhido para indução da expressão em larga escala na presença de 1 mM de IPTG foi 3h após a indução. A linha M.W. representa o Marcador de peso molecular: *Spectra*TM Multicolor Broad Range Protein Ladder

5.2.4 As proteínas recombinantes LaRPA Δ Obfold-1, LaRPA Δ Cterm e LaRPA Δ Obfold-1-2 são encontradas na fração insolúvel do extrato.

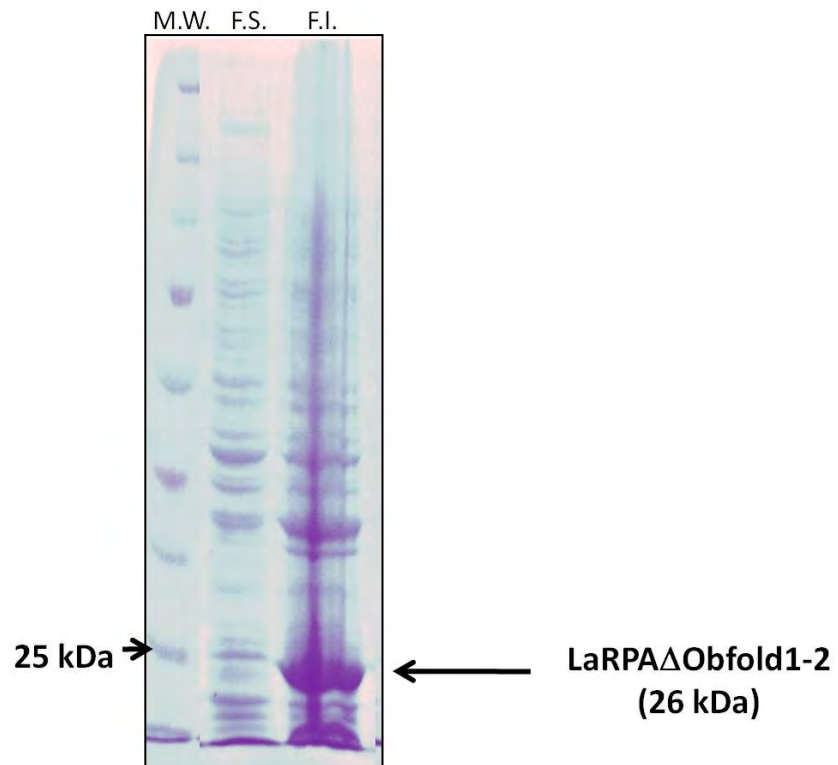
Os três mutantes foram expressos em 1L de meio LB após 3 horas de indução com IPTG. Para verificar a solubilidade das proteínas, tanto a fração insolúvel (corpúsculos de inclusão) quanto a fração solúvel (sobrenadante do extrato) foram submetidos a fracionamento em gel SDS-PAGE 12%, corado com Coomassie Blue. De acordo com os resultados mostrados na Fig. 12, foi observado que as proteínas recombinantes LaRPA Δ Obfold-1, LaRPA Δ Cterm, LaRPA Δ Obfold-1-2 encontram-se na fração insolúvel do extrato.



A



B



C

Figura 12. As proteínas LaRPA Δ Obfold1, LaRPA Δ Cterm e LaRPA Δ Obfold1-2 são expressas na fração insolúvel do extrato bacteriano. Gel SDS PAGE 12% corado com Coomassie Blue. Os itens A,B e C mostram que as três proteínas recombinantes só foram recuperadas recuperada na fração insolúvel do extrato bacteriano. Nos três géis, F.S. representa a fração solúvel do extrato bacteriano (sobrenadante) e F.I. representa a fração insolúvel (pellet), onde são encontradas as três proteínas recombinantes. Em B, a linha M.W. representa o marcador de peso molecular: SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range da BIO-RAD. Em C, a linha M.W. representa o marcador de peso molecular: *Spectra*TM Multicolor Broad Range Protein Ladder

5.2.5. Esquema de purificação dos três mutantes truncados de LaRPA-1

Foi testado neste projeto um esquema de purificação seguindo-se o protocolo descrito em LIRA et al (2009). Após a indução, as células bacterianas são submetidas ao tampão de lise e sonicação, acarretando no rompimento de sua parede e membrana, expondo assim seu produto intracelular e as proteínas recombinantes de interesse. Por se encontrar na fração insolúvel do extrato, é necessária ressolubilização de proteínas utilizando-se uréia, segundo esquema da figura 13. As proteínas recombinantes possuem uma cauda de 6XHistidina no N-terminal, a qual tem forte afinidade pelo níquel, presente na coluna de afinidade Hitrap Chelating. A fração insolúvel do extrato bacteriano é ressolubilizada em 7M uréia e glicina 50mM pH 8,0 e é passada por essa coluna de afinidade para a purificação das proteínas de interesse. Os eluatos da coluna que contém a proteína recombinante são dialisados para a retirada da uréia e demais sais (Ver material e métodos). Após a diálise, as proteínas purificadas são concentradas se necessário, e estocadas a -80°C.



Figura 13. Esquema de purificação utilizado para a obtenção das proteínas LaRPA-1 Δ Obfold1, LaRPA-1 Δ Cterm e LaRPA-1 Δ Obfold1-2.

5.3.1 Purificação da proteína LaRPA Δ Obfold-1.

A proteína LaRPA-1 possui um domínio que foi mapeado usando-se ferramentas in silico, denominado OB-fold putativo, chamado de OB-fold 2 (SIQUEIRA NETO ET AL., 2007), e na região C-terminal da proteína nenhum domínio estrutural foi encontrado (LIRA, 2009).

Esta proteína possui peso molecular estimado em 41kDa e foi purificada de acordo com o esquema da figura 13. A proteína foi purificada diversas vezes e em todas elas se mostrou estável, principalmente quando estocada a temperatura de -80°C .

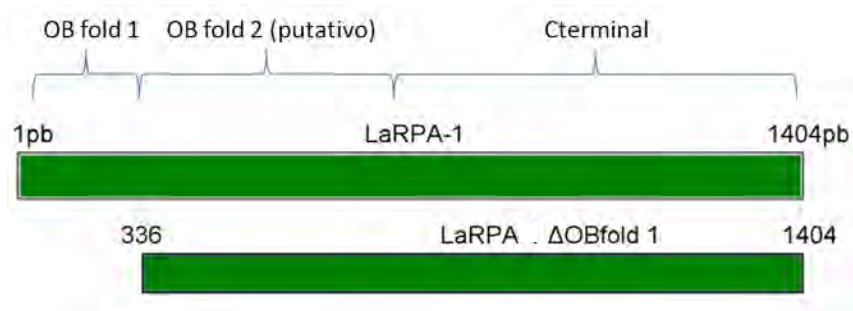


Figura 14. Esquema mostrando a localização do mutante LaRPA Δ Obfold1 em relação a LaRPA-1 de *Leishmania amazonensis*. A proteína LaRPA Δ Obfold1 possui o OB-fold 2 e o Cterminal da proteína LaRPA-1.

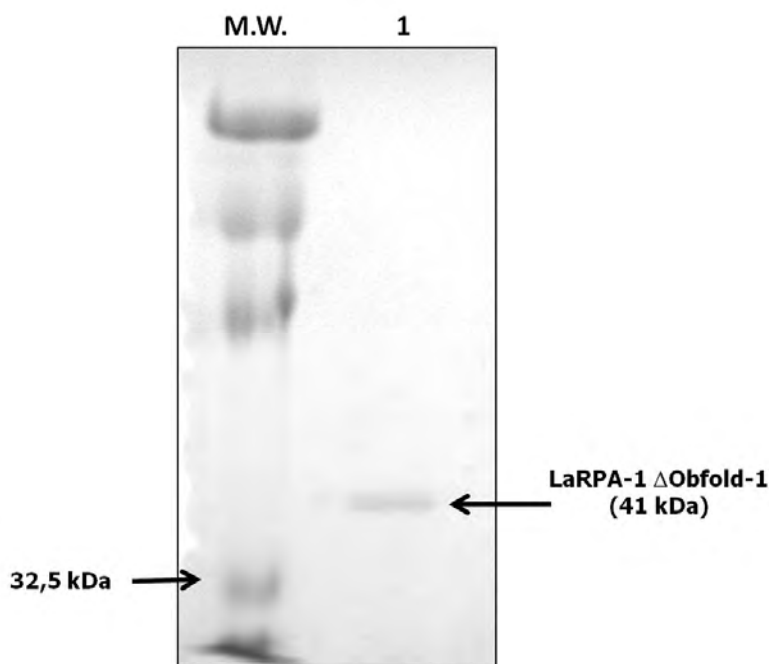


Figura 15. Purificação da proteína LaRPAΔObfold-1. Gel SDS-PAGE 12% corado com Coomassie blue mostrando perfil de separação da proteína recombinante purificada LaRPAΔObfold-1 (linha 1). A linha M.W. representa o marcador de peso molecular Kaleidoscópio (BioRad)

5.3.2 Análise da estrutura secundária da proteína recombinante LaRPAΔObfold e por espectroscopia de Dicroísmo Circular(CD).

Esta técnica 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 (RAMOS, 2004). Foi realizado um ensaio de Dicroísmo Circular junto ao Departamento de Física e Biofísica da UNESP – Botucatu, em colaboração com o grupo do Prof. Marcos Fontes, para analisar se a proteína purificada LaRPAΔObfold-1 estava enovelada para futura utilização em outros ensaios, como *pull down*, entre outros. As medidas foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco modelo J-815 (JASCO Inc., Tokyo, Japan) a uma temperatura de 20°C controlada por um sistema peltier, utilizando uma cubeta de quartzo de 0,5 mm, com uma velocidade de leitura de 50 nm/min e um *bandwidth* de 2 nm. O espectro obtido é resultante da média de 20 espectros obtidos após a subtração da medida da solução tampão e da normalização para a unidade elipcidade residual molar $[\theta]$. Os dados foram plotados utilizando o software Origin 8.0. A LaRPAΔObfold-1 foi

analisada a 260 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ em tampão com 20mM de glicina e 20mM de NaCl- pH8,0. O espectro de CD da LaRPA Δ Obfold-1 (Fig. 18) indica que a proteína encontra-se enovelada e adequada para ser utilizada em ensaios de interação. A tabela 3 mostra uma predição da quantidade dos elementos de estrutura secundária, utilizando-se o algoritmo CONTINNL (SREERAMA & WOODY, 2000) para a deconvolução da curva.

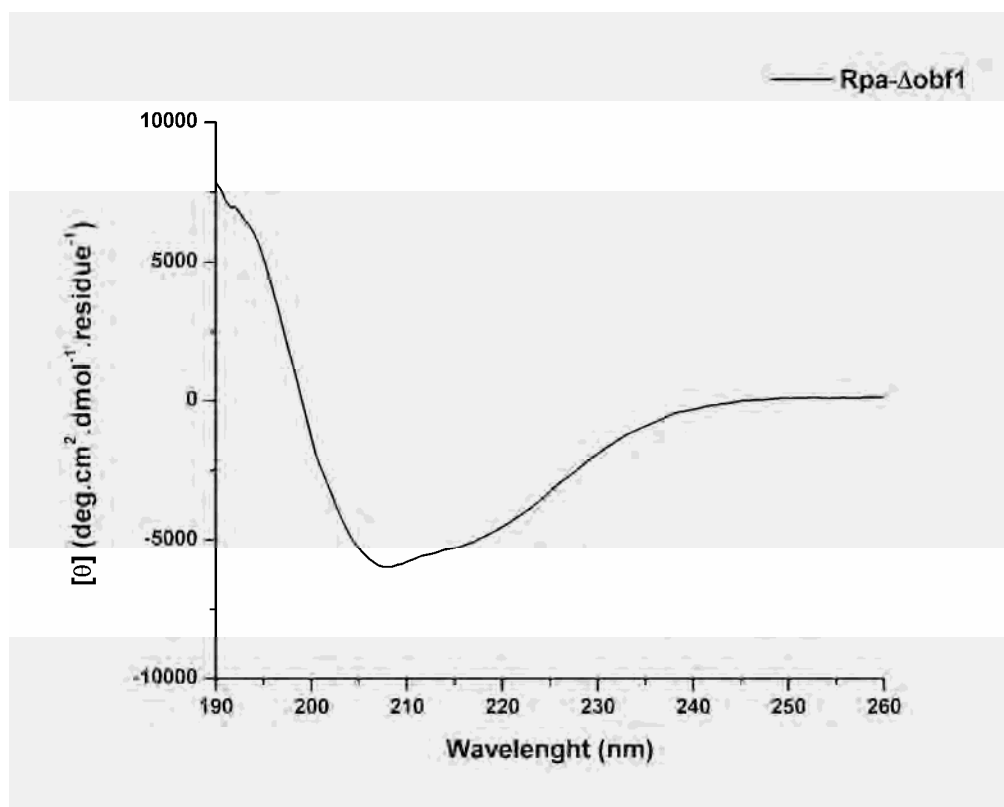


Figura 16: Espectro de CD da LaRPA Δ Obfold-1

Tabela 3: Predição da quantidade dos elementos de estrutura secundária da proteína LaRPA- Δ Obfold-1

realizada a partir do espectro de CD obtido utilizando o algoritmo CONTINNL (Sreerama & Woody, 2000).

	Helix Elements	Beta content	Turns	Unordered
<i>LaRPAΔObfold-1</i>	14,4%	33,2%	20,9%	31,4%

5.4.1 Purificação da proteína LaRPA Δ Obfold1-2

A proteína LaRPA Δ Obfold1-2 foi purificada (fig. 20) seguindo-se os mesmos passos descritos na figura 14. Esta proteína apresenta apenas a região Cterminal, não possuindo nenhum domínio do tipo Obfold (fig. 19). A proteína purificada se mantém estável, principalmente em temperatura -80°C.

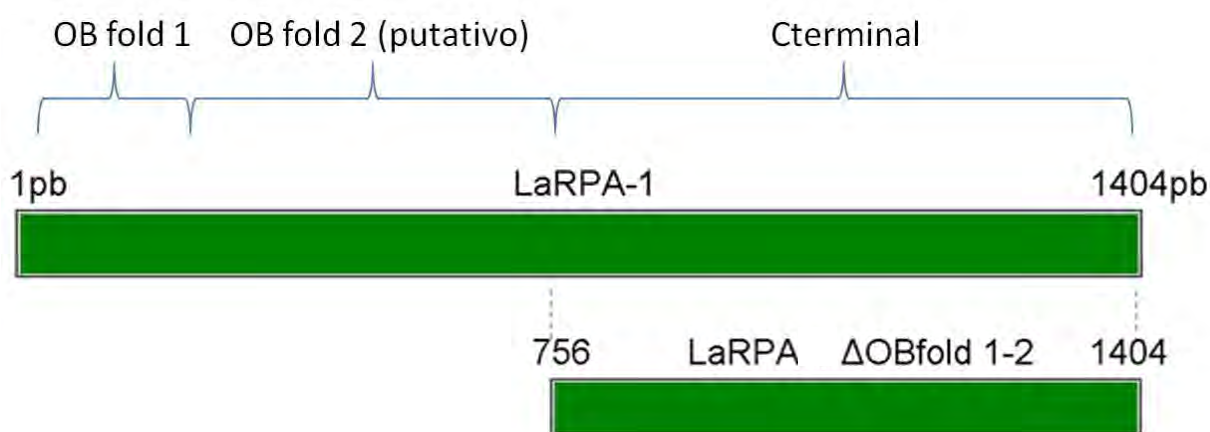


Figura 17. Estrutura da proteína LaRPA Δ Obfold-1-2 em comparação com a LaRPA-1 de *Leishmania amazonensis*. A proteína LaRPA Δ Obfold1 possui apenas a região C terminal da proteína LaRPA-1.

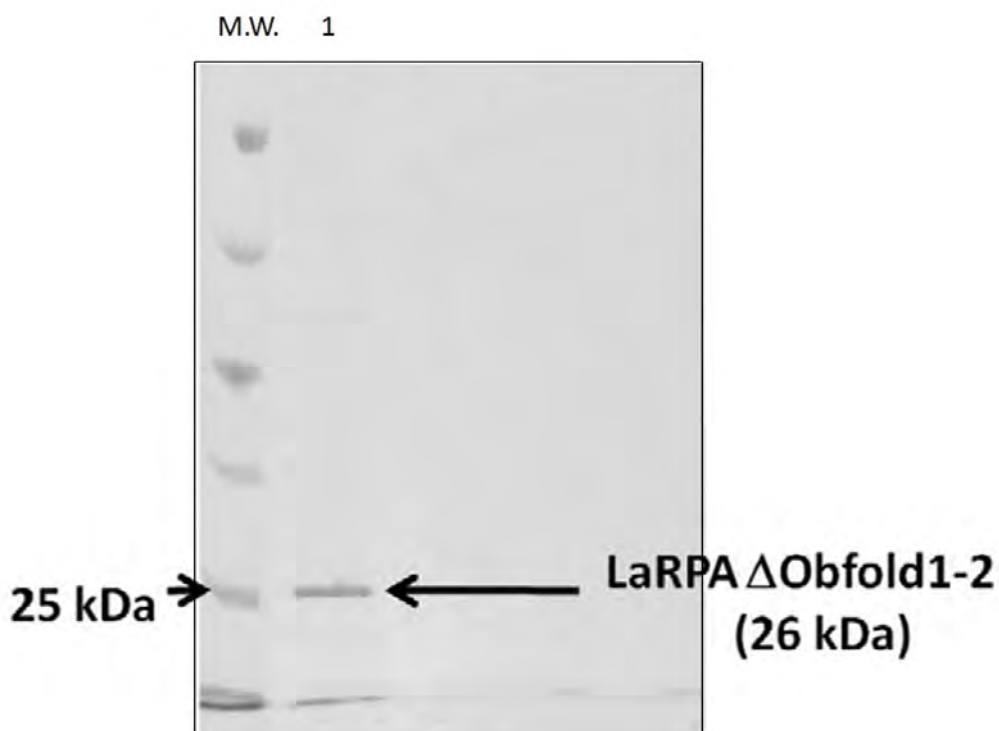


Figura 18. Purificação da proteína LaRPAΔObfold-1-2. Gel SDS-PAGE 12% corado com Coomassie blue. A linha 1 mostra o perfil de separação da proteína recombinante purificada LaRPA ΔObfold1-2. A linha M.W. representa o marcador de peso molecular : *Spectra™* Multicolor Broad Range Protein Ladder.

5.4.2 Análise da estrutura secundária da proteína recombinante LaRPAΔObfold-1-2 e por espectroscopia de Dicroísmo Circular(CD).

O mutante LaRPAΔObfold-1-2 foi submetido a análise de CD logo após sua purificação e mostrou-se desenovelado em sua forma pura. Para tentar reverter esse quadro, realizamos novamente todas as etapas de purificação e, antes da diálise, metade das amostras foi tratada com 50μg/ml de heparina, já que heparina já foi usada com sucesso como uma chaperona artificial durante ensaios de enovelamento da proteína LaRPA-1 (LIRA, 2009). Realizamos o ensaio de Dicroísmo Circular (CD) da mesma forma que o realizado com a proteína LaRPAΔObfold-1, descrito anteriormente neste relatório. Dois tampões foram utilizados, um com 20 mM de glicina e 20mM de NaCl pH8,0 para analisar a metade da amostra que continha apenas a proteína purificada, e um segundo tampão que possuía além de glicina e de NaCl, heparina na mesma concentração que a porção da amostra enriquecida com heparina, a 50ug/ml.

A proteína foi analisada a uma concentração de $280 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. A proteína sem heparina mostrou-se desenovelada ou com espectro de dicroísmo circular característico de proteína desenovelada, repetindo o ocorrido anteriormente. Porém a amostra tratada com heparina apresentou espectro de dicroísmo circular característico de proteína enovelada. Analisando este resultado, sugerimos que o domínio putativo Obfold2 pode conter aminoácidos importantes para o correto enovelamento da proteína, já que o mutante LaRPA Δ Obfold-1 que contém o domínio OBfold2 enovelou-se perfeitamente, em comparação com o mutante LaRPA Δ Obfold-1-2. A tabela 4 mostra uma predição da quantidade dos elementos de estrutura secundária presentes no mutante LaRPA Δ Obfold-1-2, utilizando-se o algoritmo CONTINNL (Sreerama & Woody, 2000) para a deconvolução da curva.

Figura 19: Espectro de CD da Rpa Δ Obfold-1-2 com heparina e sem heparina. A proteína adquire folding ao interagir com a heparina.

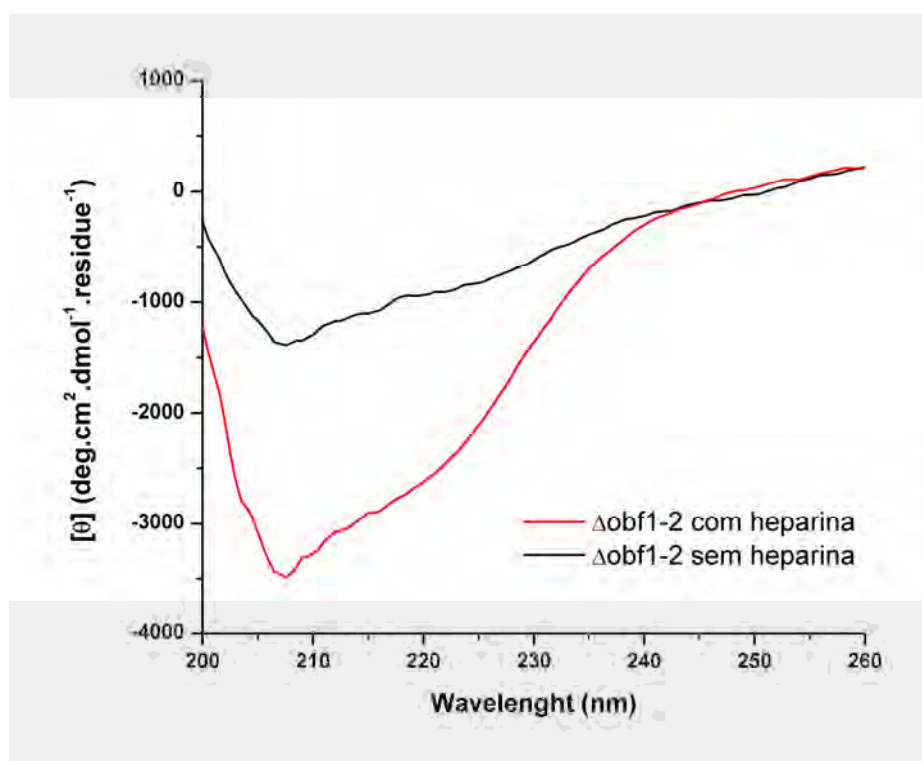


Tabela 4. Predição da quantidade dos elementos de estrutura secundária da LaRPA Δ Obfold-1-2 realizada a partir do espectro de CD obtido utilizando o algoritmo CONTINNL (Sreerama & Woody, 2000).

	Helix Elements	Beta content	Turns	Unordered
LaRPA Δ Obfold1-2	6%	39%	21,7%	33%

5.5.1 Purificação da proteína LaRPA Δ Cterm

A proteína LaRPA Δ Cterm primeiramente foi purificada seguindo-se os passos da figura 13, porém essa proteína mostrou-se pouco estável após a purificação e degradou em questão de poucos dias, independentemente da temperatura utilizada para seu armazenamento (foram testadas as temperaturas: ambiente, a 4°C e -80°C). Ao repetir a purificação na coluna Hitrap Chelating, notou-se a presença de vários contaminantes que co-purificaram com a proteína, tornando-a inutilizável para ensaios estruturais usando espectroscopia de dicroísmo circular. Partimos para um novo esquema de purificação usando purificação sequencial em duas colunas cromatográficas, a primeira foi uma coluna de troca iônica do tipo Q-Sepharose e em seguida juntamos os eluatos que continham a proteína de interesse, visualizada em gel SDS-PAGE 12%, e carregamos a segunda coluna, no caso uma coluna de afinidade do tipo Hitrap Chelating. Analisando-se por gel SDS-PAGE 12% a purificação da proteína na primeira coluna, a amostra possuía alguns pequenos contaminantes, porém, ao passar na segunda coluna, a proteína não apareceu em gel SDS-PAGE corado com Coomassie Blue, podendo ter ficado em baixa concentração ao passar em duas colunas. Para garantir que não tivemos erro na interação da amostra com a coluna de afinidade, o flow trough da coluna de afinidade Hitrap Chelating foi submetido a separação por gel SDS-PAGE 12%, corado com coomassie blue. O perfil de separação do gel mostrou que proteína não estava no flow trough, portanto nossa hipótese da proteína ter ficado em baixa concentração ao passar por duas colunas é a mais aceitável. Repetimos a purificação utilizando apenas a coluna Hitrap Chelating, adicionando DNases e RNases. A proteína foi obtida purificada com pouquíssimos contaminantes (Fig. 23.). Desta forma, concluímos que o ideal é a utilização apenas de uma coluna e o tratamento da amostra com DNases e RNases para evitar ao máximo o risco de contaminantes.

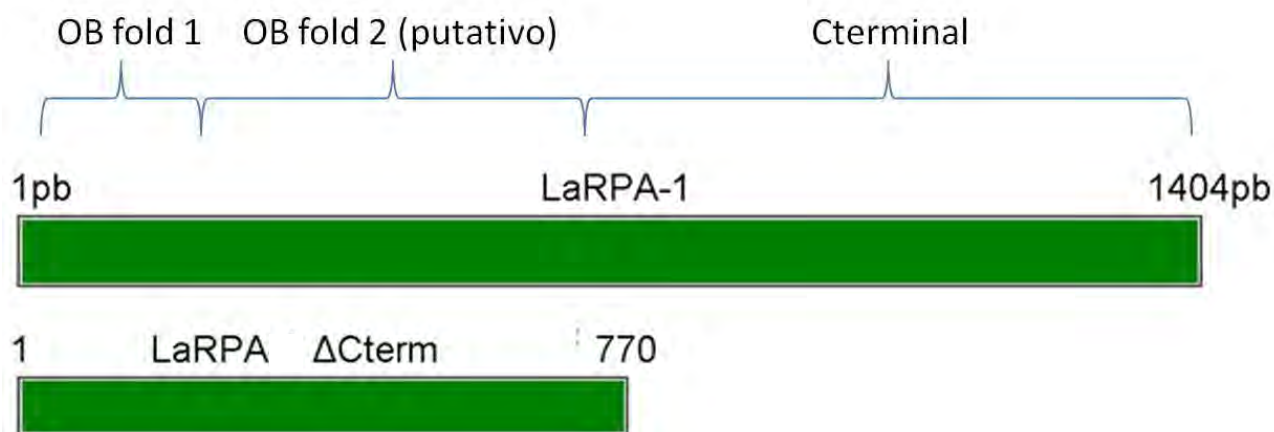


Figura 20. Estrutura da proteína LaRPAΔCterm em comparação com a LaRPA-1 de *Leishmania amazonensis*. A proteína LaRPAΔCterm possui os dois OBfold da proteína LaRPA-1.

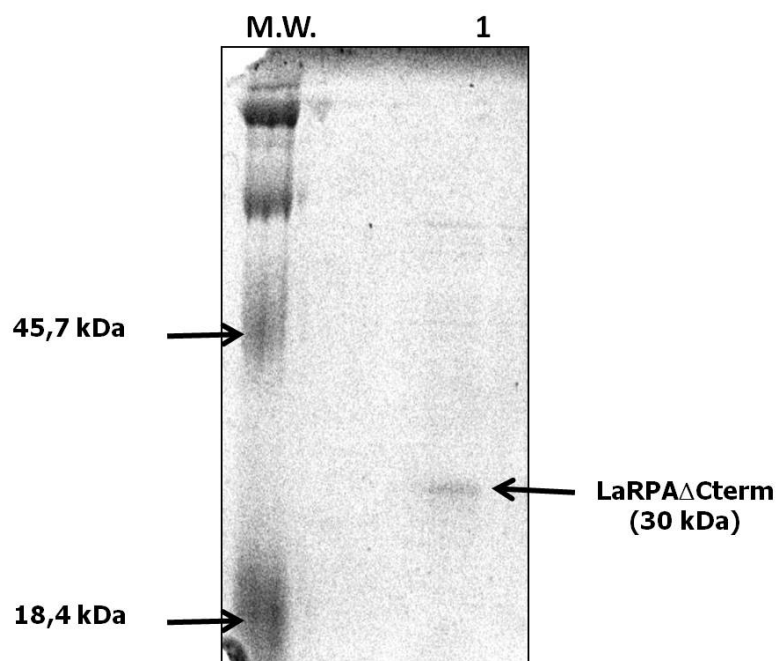


Figura 21. Purificação da proteína LaRPAΔCterm em coluna Hi-Trap Chelating. Gel SDS-PAGE 12% corado com Coomassie blue mostrando perfil de separação da proteína recombinante purificada LaRPA ΔCterm (linha B). Marcador de peso molecular Kaleidoscópio (BioRad) (linha A).

5.5.2 Análise da estrutura secundária da proteína recombinante LaRPA Δ Cterm e por espectroscopia de Dicroísmo Circular(CD).

Realizamos o ensaio de Dicroísmo Circular (CD) da mesma forma que o realizado com as outras duas proteínas recombinantes, descrito anteriormente neste relatório. A heparina também se fez necessária para o completo enovelamento da proteína. O tampão utilizado possuía foi o mesmo que o da proteína LaRPA Δ Obfold1-2, contendo glicina, NaCl e heparina na mesma concentração já descrita. A proteína foi analisada a uma concentração de a 464 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. A proteína LaRPA Δ Cterm tratada com heparina apresentou espectro de dicroísmo circular característico de proteína enovelada e pronta para utilização em experimentos. A tabela 5 mostra uma predição da quantidade dos elementos de estrutura secundária presentes no mutante LaRPA Δ Obfold-1-2, utilizando-se o algoritmo CONTINNL (Sreerama & Woody, 2000) para a deconvolução da curva.

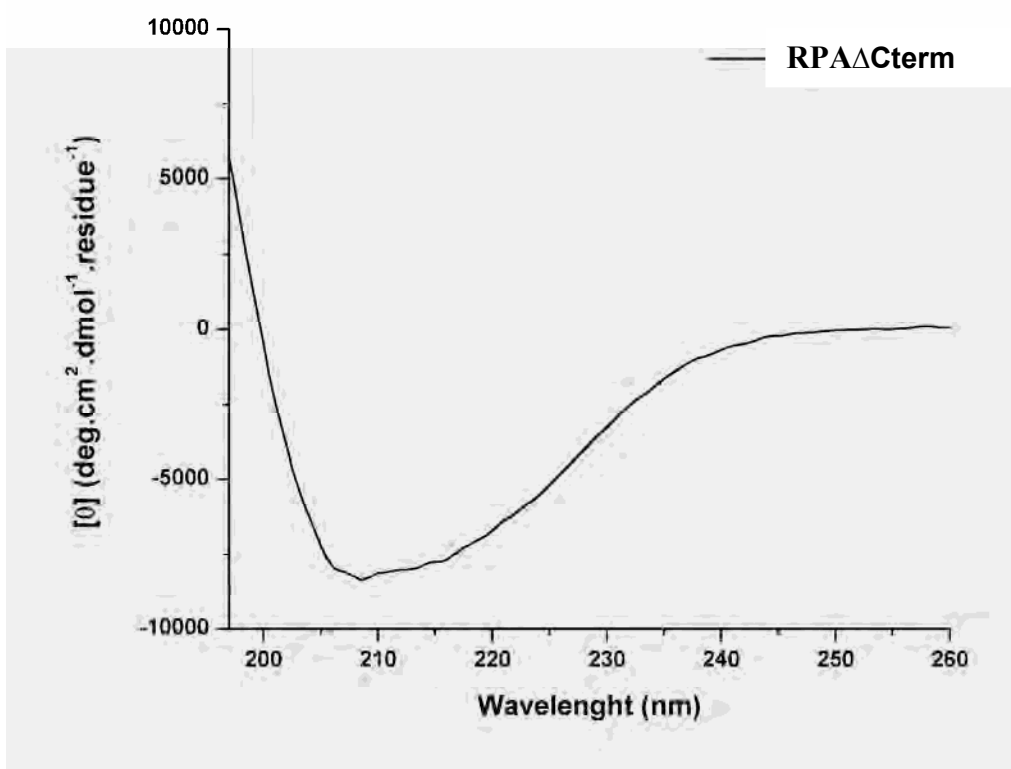


Figura 22: Espectro de CD da LaRPA Δ Cterm

Tabela 5 : Predição da quantidade dos elementos de estrutura secundária da LaRPA Δ Cterm realizada a partir do espectro de CD obtido utilizando o algoritmo CONTINNL (Sreerama & Woody, 2000).

	Helix Elements	Beta content	Turns	Unordered
LaRPA Δ Cterm	18,4%	30,1%	21,7%	29,9%

5.6 As proteína LaRPA Δ Obfold1, LaRPA Δ Cterm e LaRPA Δ Obfold1-2 são reconhecidas pelo soro anti LaRPA-1 em ensaio de Western Blot.

Para verificar se os mutantes construídos eram reconhecidos pelo soro anti-LaRPA-1, foram realizados ensaios de *Western blotting* com a proteínas purificadas em coluna de afinidade revelados com soro primário anti-LaRPA-1 obtido em coelho (Siqueira-Neto et al., 2007). O resultado na Fig.25 mostra que os mutantes foram reconhecidos pelo soro anti-LaRPA-1, confirmando o sucesso da expressão e da purificação dos mesmos.

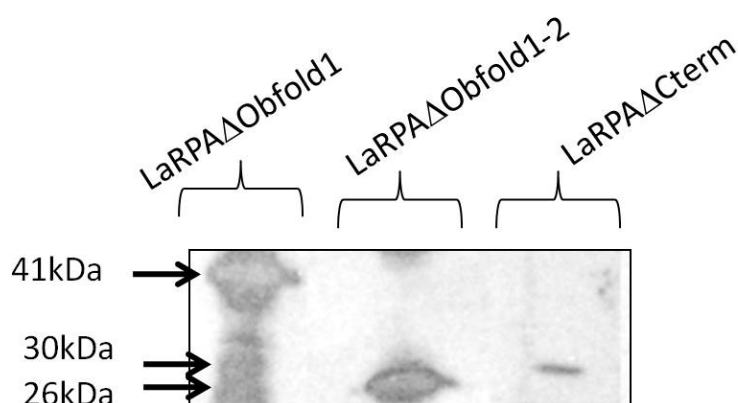


Figura 23. As proteínas recombinantes LaRPA Δ Obfold 1, LaRPA Δ Cterm e LaRPA Δ Obfold 1-2 são reconhecidas pelo soro anti-LaRPA-1 em ensaio de Western Blot

5.7 Estudos estruturais teóricos com a LaRPA-1

A fim de se conhecer melhor as características estruturais da LaRPA-1 inteira, bem como dos mutantes aqui construídos, realizamos inicialmente uma busca no software *on line* PFAM (FINN, 2010) para a caracterização dos domínios que compõem a estrutura dessa proteína. Essa busca resultou na predição de dois domínios diferentes na estrutura da LaRPA-1. Um domínio OB-fold (*E-value*: $2,3 \times 10^{-9}$) na região N-terminal (23-110) e um domínio RFA-1 (*E-value*: $1,5 \times 10^{-40}$) na região C-terminal (293-433). Interessantemente, o PFAM não conseguiu identificar o domínio putativo OBfold-2, o qual foi primeiramente identificado usando o programa psi-blast (SIQUEIRA NETO, 2007) porém o PFAM indica a existência de um domínio RFA-1 na porção C-terminal da proteína LaRPA-1. Os domínios chamados OB-fold possuem forte interação com DNA simples fita (KOONIN et al, 2000). Já o domínio RFA-1, está envolvido na interação com outras proteínas principalmente das maquinarias de replicação, reparo e recombinação do DNA (KOLPASHCHIKOV et al, 2000).

Posteriormente, realizou-se uma busca por estruturas homólogas no *Protein Data Bank* (PDB) utilizando o software *on line* HHPRED (SÖDING, 2005). Essa busca resultou em informações bastante interessantes. A região compreendida entre os aminoácidos 6 e 250 (*E-value*: 0) apresentou homologia estrutural com o domínio de ligação de DNA fita simples da RPA humana que contém domínios OBfold (PDB ID 1JMC) e a região compreendida entre os aminoácidos 270 e 450 (porção C-terminal) apresentou homologia (*E-value*: 3×10^{-44}) com a subunidade da RPA humana que contém um domínio RFA-1 (cadeia C; PDB ID 1L1O), da mesma maneira que o PFAM havia mostrado. A partir disso, então, criamos através do software MODELLER *on line* (ref) um modelo estrutural teórico preliminar da LaRPA-1 (Fig. 26) utilizando a técnica de *threading* usando como modelo para a região entre os aminoácidos 6 e 250, a estrutura 1JMC e para a região C-terminal, a estrutura 1L1O. Esta estrutura teórica nos mostrou dois domínios OB-fold na região entre os aminoácidos 6 e 250 e um domínio RFA-1 na porção C-terminal entre os aminoácidos 270 e 450 (Fig. 26), ao contrário do que era previsto, já que o esperado era apenas dois domínios, OB-fold 1 e o domínio putativo OB-fold2 (SIQUEIRA-NETO, 2007).

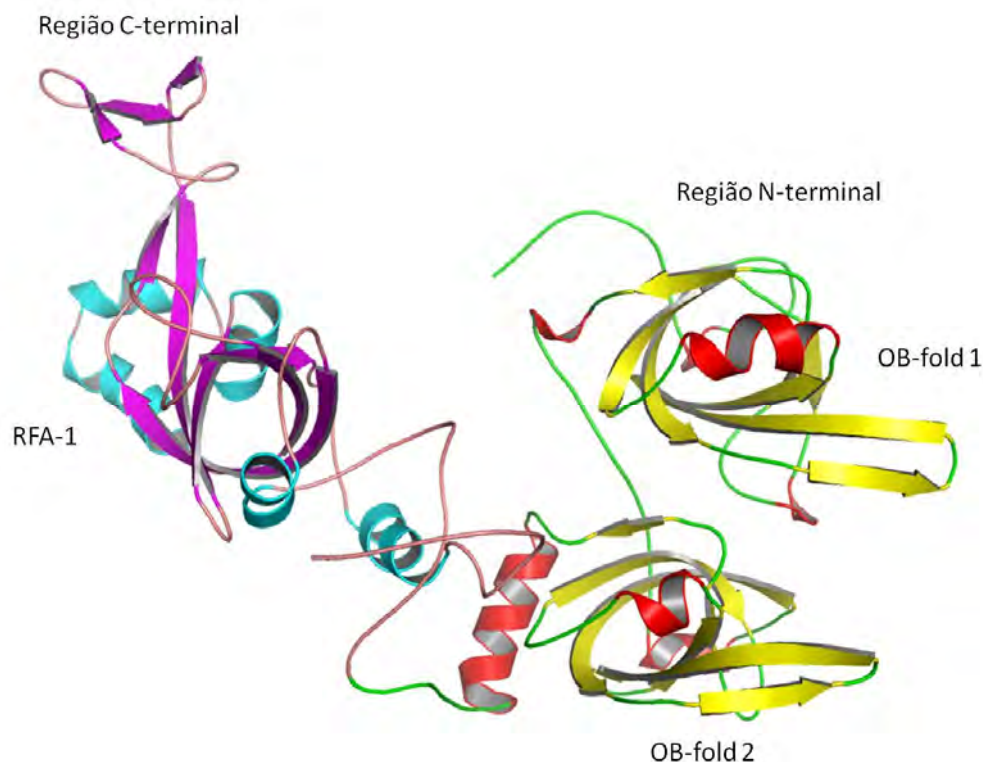


Figura 24. Modelo estrutural teórico preliminar da LaRPA-1 em cartoon mostrando os dois domínios OBfolding na porção N-terminal (alfas hélices em vermelho e folhas beta em amarelo) e um domínio RFA-1 na porção C-terminal (alfas hélices em azul e folhas beta em magenta). Figura gerada pelo PyMol (Delano, 2002).

Conforme já observado, a estrutura da LaRPA-1 foi construída para melhor visualização dos mutantes descritos neste trabalho. O mutante LaRPA Δ Obfold-1 possui o Obfold2 e a região C-terminal (RFA-1). O mutante LaRPA Δ Cterm possui o Obfold1 e Obfold2. O mutante LaRPA Δ Obfold-1-2 possui apenas a região C-terminal da proteína (RFA-1).

O domínio RFA-1 localizado na porção C-terminal condiz com os dados de dicroísmo circular aqui apresentados, porque o mutante LaRPA Δ Obfold-1-2 apresenta apenas a região C-terminal e, segundo a figura 21, essa proteína enovela na presença de heparina, mimetizando uma interação proteína-DNA.

Estes achados com certeza aumentam nosso conhecimento sobre a LaRPA-1 e podem significar avanços no entendimento de sua função nas maquinarias de replicação telomérica e convencional do parasita.

6. Referências Bibliográficas

- . ALMEIDA, M. C., VILHENA, V., BARRAL, A. & BARRAL-NETTO, M. (2003). Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98, 861-870.
- . ARIAS, J., MONTEIRO, P., ZICKER, F. (1996). The reemerge of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emm. Infect. Dis.*, 2: 145-146.

- . BASU, M. K. e RAY, M. (2005). Macrophage and Leishmania: an unacceptable coexistence. *Crit Rev Microbiol* 31, 145-154.
- . BEVERLEY, S.M. (1991) Gene amplification in Leishmania. *Annu Rev Microbiol.* 45:417-44
- . BLACKBURN, E. H. 2001 Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106, 661–673.
- . BOCHKAREV, A., BOCHKAREVA, E. (2004) From RPA to BRCA2: lessons from single-stranded DNA binding by the OB-fold. *Curr Opin Struct Biol.* 14:36-42.
- . CANO, M. I., DUNGAN, J. M., AGABIAN, N. e BLACKBURN, E. H. (1999). Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96,3616-21.
- . 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.
- . DA SILVA, PEREZ, A.M., SILVEIRA, R.C.V., MORAES, C.E., SIQUEIRA-NETO, FREITAS-JUNIOR, L.H., CANO, M.I.(2010) The Leishmania amazonensis TRF (TTAGGG repeat-binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres. *BMC Microbiology* 10, 136-144.
- . DE LANG, T., LECOEUR, H. & PRINA, E. (2009). Imaging Leishmania development in their host cells. *Trends Parasitol* 25, 464-473.
- . DMITRIEV, P. V., PETROV, A. V. & DONTSOVA, O. A. (2003). Yeast telosome complex: components and their functions. *Biochemistry (Mosc)* 68, 718-734.
- . 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.
- . FINN R.D., MISTRY J., TATE J., COGGILL P., HEGER A., POLLINGTON J.E., GAVIN O.L., GUNESKARAN P., CERIC G., FORSLUND K., HOLM L., SONNHAMMER E.L., EDDY S.R., BATEMAN A. *The Pfam protein families database: Nucleic Acids Research* (2010) Database Issue 38:D211-222
- . 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.
- . GILSON, E. & GELI, V. (2007). How telomeres are replicated. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 825-838.
- . GRIFFITH, J. D., COMEAU, L., ROSENFELD, S., STANSEL, R. M., BIANCHI, A., MOSS, H. & de LANGE, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514.
- . IVENS, A. C., PEACOCK, C. S., WORTHEY, E. A., et al. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309, 436-442.
- . JACOBS, D.M., LIPTON, A.S., ISERN, N.G., DAUGHDRILL, G.W., LOWRY, D.F., GOMES, X., WOLD, M.S. (1999) Human replication protein A: global fold of the N-terminal RPA-70 domain reveals a basic cleft and flexible C-terminal linker. *J Biomol NMR.* 14:321-31.
- . JOHNSTON, D. A., BLAXTER, M. L., DEGRAVE, W. M., FOSTER, J., IVENS, A. C. e MELVILLE, S. E. (1999). Genomics and the biology of parasites. *Bioessays* 21, 131-147.

- . 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.
- . KEDZIERSKI, L., ZHU, Y., HANDMAN, E. (2006) Leishmania vaccines: progress and problems. *Parasitology*. 133 Suppl:S87-112.
- . 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.
- . KOONIN E.V., WOLF YI, ARAVIND L; , *Adv Protein Chem* 2000;54:245-275.: Protein fold recognition using sequence profiles and its application in structural genomics. *PUBMED*:10829230
- . KOLPASHCHIKOV DM, PESTRYAKOV PE, WLASSOFF WA, KHODYREVA SN, LAVRIK OI; , *Biochemistry (Mosc)*. 2000;65:160-163.: Study of interaction of human replication factor A with DNA using new photoreactive analogs of dTTP. *PUBMED*:10713540
- . LIRA, C.B; GUI, K.E; PEREZ, A.M; VIVEIROS, R.C.S; RAMOS, C.H; CANO, M.I. (2009). Replication protein A subunit 1, *Leishmania amazonensis*, telomere-binding protein, protein refolding, heparin, spectroscopic analysis. Elsevier Editorial System(tm) for BBA.
- . 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.
- . 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.
- . MORENO I., DOMÍNGUES M., CABAÑES D., AIZPURUA C., TORAÑO A. (2010) Kinetic Analysis of Ex Vivo Human Blood Infection by *Leishmania*. *PLoS Negl Trop Dis* 4(7): e743. doi:10.1371/journal.pntd.0000743
- . MORRISETT J.D., DAVID, J.S., POWNALL, H.J., GOTTO, A.M. JR. (1973). Interaction of an apolipoprotein (apoLP-alanine) with phosphatidylcholine. *Biochimie* 12, 1290-1299.
- . MUNOZ-JORDAN, J. L., CROSS, G. A., DE LANGE, T. & GRIFFITH, J. D. (2001). t-loops at trypanosome telomeres. *EMBO J* 20, 579-588.
- . NEVES, D. P., MELO, A. L., GENARO, O. e LINARDI, P. M. (2005). *Parasitologia Humana*, 11a Edicao. pp. 31-72: Ed. Atheneu.
- . OLIVIER, M., GREGORY, D. J. e FORGET, G. (2005). Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* 18, 293-305.
- . 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.*, 25: 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.

- . RAMOS, C.H.I. A spectroscopic-based laboratory course for protein conformational studies, *Biochem. Mol. Biol. Edu.* 32 (2004) 31–34.
- . SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- . SCHRAMEKE, V., LUCIANO, P., BREVET, V., GUILLOT, S., CORDA, Y., IONGHESE, M. P., GILSON, E. e GELI, V. (2004). RPA regulates telomerase action by providing est1p access to chromosome ends. *Nature Genetics*, 36, 46-54.
- . SEGOVIA, M. (1994) Leishmania gene amplification: a mechanism of drug resistance. *Ann Trop Med Parasitol.* 88:123-30.
- . SREERAMA, N., AND WOODY, R. W. (2000) Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. *Analytical Biochemistry* 287, 252-260
- . 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.
- . SIMPSON L. (1987) The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol.* 41, 363-82.
- . SMOGORZEWSKA, A. & DE LANGE, T. (2004). Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* 73, 177-208.
- . SÖDING, J. (2005) Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* 21: 951-960.
- . SREERAMA, N., and WOODY, R. W. (2000) Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. *Analytical Biochemistry* 287, 252-260
- . STEWART, S. A. e WEINBERG, R. A. (2002). Senescence: does it all happen at the ends? *Oncogene* 21, 627-630.
- . 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.
- . TEIXEIRA, M. T. & GILSON, E. (2005). Telomere maintenance, function and evolution: the yeast paradigm. *Chromosome Res* 13, 535-548.
- . THOMAS, S., GREEN, A., STURM, N. R., CAMPBELL, D. A. e MYLER, P. J. (2009). Histone acetylations Mark origins of polycistronic transcription in Leishmania major. *BMC Genomics* 10, 152.
- . 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.
- . 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 leishmaniasis. 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.

. 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. *Nucleic Ac. Res.*, 24,1688-1694.