

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TELOMÉRICA
LaTRF EM SISTEMA BACTERIANO (pMAL)**

João Augusto Ribeiro

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

**BOTUCATU – SP
2010**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TELOMÉRICA
LaTRF EM SISTEMA BACTERIANO (pMAL)**

João Augusto Ribeiro

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano

Co-orientador(a): Rita de Cássia Viveiros da Silveira

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

**BOTUCATU – SP
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Ribeiro, João Augusto.

Clonagem, Expressão e Purificação da Proteína Telomérica LaTRF em sistema bacteriano (pMAL). / João Augusto Ribeiro. - Botucatu: [s.n.], 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Maria Isabel Nogueira Cano

Co-Orientador: Rita de Cássia Viveiros da Silveira

Capes: 20202008

1. Gene *LaTRF* - Clonagem 2. Proteína LaTRF - Expressão 3. Sistema bacteriano

Palavras-chave: Telômero; *Leishmania amazonensis*; Clonagem; LaTRF; pMAL-c5x

Dedico este trabalho aos meus pais João e Midori. Pois foram eles quem me deram, diante da distância, o maior exemplo de força, dedicação, responsabilidade e amor. Fazendo com que esta distância fosse um mero acaso na minha formação como pessoa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos amigos que fiz durante esses anos todos. A República “Sokanela”, onde sempre fizeram com que eu me sentisse em casa. Era com certeza um belo refúgio para esquecer um pouco dos problemas e dar boas risadas. Agradeço em especial ao Vinícius (Bagaço), Bruno (Funga) e Alexandre (Pênis-Vesgo) pelo exemplo de parceria que vou levar para o resto da vida.

Agradeço também meus colegas de laboratório: Rita, Arina, Marcelo e Jomar que me ajudaram sempre que precisei e fizeram com certeza com que o ambiente de trabalho se tornasse muito agradável.

A minha irmã Larissa pela paciência e principalmente pelo respeito que sempre me tratou.

A minha orientadora Bel por me dar a oportunidade de amadurecer profissionalmente, influenciando diretamente no meu crescimento e explorando sempre o que tenho de melhor.

E não poderia deixar de agradecer minha namorada Mariane, que se mostrou incansável em sempre querer me proporcionar o máximo de amor, carinho, alegria e apoio nos momentos que mais precisei.

Índice

Resumo	3
1. Introdução	4
1.1. Telômeros	4
1.2. Proteínas teloméricas e manutenção dos telômeros	5
1.3. As proteínas TRF de mamíferos	6
1.4. Protozoários <i>Kinetoplastida</i> , família Trypanosomatidae	7
1.5. <i>Trypanosoma brucei</i> e a tripanosomíase africana	8
1.6. Biologia molecular e complexo telomérico em <i>Trypanosoma brucei</i>	10
1.7. A proteína TRF em <i>Trypanosoma brucei</i> (TbTRF)	11
1.8. <i>Leishmania</i> e leishmaniose	11
1.9. Biologia molecular e complexo telomérico em <i>Leishmania amazonensis</i>	13
1.10. A proteína TRF em <i>Leishmania amazonensis</i> (LaTRF)	14
1.11. Importância de uma caracterização funcional da proteína LaTRF	15
2. Objetivos	17
3. Metodologia, plano de trabalho e forma de análise dos resultados	17
3.1. Cultura de parasitas	17
3.2. Extração de DNA genômico de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	17
3.3. Amplificação e purificação do inserto contendo o gene <i>LaTRF</i>	18

3.4. Clonagem do inserto contendo o gene	
<i>LaTRF</i> no vetor de clonagem para produtos de PCR	18
3.5. Checagem da clonagem por PCR	
de colônia e sequenciamento automático	19
3.6. Subclonagem no vetor de expressão bacteriano pMAL-c5x	19
3.6.1. Estratégia de clonagem: digestão, purificação e ligação	
do inserto no vetor de expressão pMAL-c5X	20
3.6.2. Transformação bacteriana da	
construção pMAL + <i>LaTRF</i>	21
3.6.3. Testes de expressão para futura purificação	
da proteína recombinante LaTRF	21
3.7. Análise da expressão da proteína LaTRF utilizando SDS-PAGE seguido	
de “Western Blot” revelado com soros imunes específicos	22
4. Resultados e discussão	24
4.1. Amplificação por PCR do gene <i>LaTRF</i> para subclonagem	
no vetor de expressão pMAL	24
4.2. Purificação dos produtos de PCR	25
4.3. Clonagem do gene <i>LaTRF</i> no vetor TOPO-TA <i>cloning</i>	25
4.4. Extração plasmidial em pequena escala da ligação <i>LaTRF</i> -TOPO	27
4.5. Suclonagem do gene <i>LaTRF</i> em vetor de expressão pMAL-c5x	27
4.6. Teste da expressão em pequena escala da proteína	
recombinante rLaTRF em fusão com a MPB	29
5. Conclusão	33
Referências bibliográficas	34

Resumo

As proteínas da família TRF2 (“TTAGGG repeat-binding factor 2”) fazem parte de complexos multiprotéicos responsáveis pela manutenção dos telômeros de alguns eucariotos. Elas apresentam domínios funcionais que a caracterizam como proteínas que interagem com DNA telomérico na forma de dupla fita. São eles, o domínio de interação com o DNA do tipo Myb-like, localizado na porção C-terminal, um domínio ácido N-terminal e um domínio de homodimerização TRFH (“TRF homology domain for homodimerization”). A proteína TRF2 também está envolvida na formação de estruturas teloméricas terminais denominadas “*t*-loops”. O intuito deste projeto é a clonagem, expressão em vetor bacteriano (pMAL) e a purificação de uma proteína homóloga as proteínas teloméricas TRFs humana em parasitas do gênero *Leishmania*, especificamente a espécie *Leishmania amazonensis* (LaTRF). Primeiramente foram desenhados iniciadores (*primers*) utilizados para a amplificação da sequência *LaTRF* por PCR. O(s) produto(s) de amplificação foram clonados em vetores de clonagem para produtos de PCR e sequenciados para análise. Uma vez obtida a sequência da *LaTRF*, o inserto contendo o gene foi subclonado direcionalmente e na mesma fase de leitura do vetor de expressão bacteriano (pMAL-c5x, NEB) para obtenção e futura purificação da proteína recombinante. Verificou-se a expressão da proteína recombinante LaTRF utilizando SDS-PAGE e “Western Blot”. Pelos resultados obtidos na análise de expressão em pequena escala da proteína recombinante, foi observado possíveis indícios de que esta esteja sendo expressa. Com isso, torna-se possível a tentativa de uma expressão em grande escala utilizando esse mesmo sistema bacteriano (pMAL) a fim de se obter a proteína purificada que poderá ser futuramente utilizada para ensaios de “pull-down” dentre outras aplicações.

Palavras-chave: Telômero; *Leishmania amazonensis*; Clonagem; LaTRF; pMAL-c5x

1. Introdução

1.1. Telômeros

Telômeros são complexos de proteína-DNA localizados nas extremidades dos cromossomos. Entre suas principais funções destaca-se a proteção dos terminais cromossômicos, impedindo a fusão destes, e a degradação cromossômica pela maquinaria de reparo (BLACKBURN et al., 1984). Eles são formados por sequências repetidas em tandem do tipo 5' TTAGGG 3' terminando em uma protrusão 3' simples fita denominada “3' G-overhang”, que é substrato para a elongação dos telômeros pela enzima telomerase e para a interação de proteínas teloméricas envolvidas na manutenção do tamanho e proteção dos terminais cromossômicos (KLOBUTCHER et al., 1981; BLACKBURN, 2001; SMOGORZEWSKA e DE LANGE, 2004; LIRA et al., 2007). Em humanos, leveduras, protozoários ciliados e *Trypanosoma brucei* foi observado que esses terminais cromossômicos podem adquirir conformações em forma de laço (t-loop) ou em forma de uma estrutura denominada G-quadruplex (“G-quartet” ou G4 DNA), as quais parecem proteger os telômeros da ação da maquinaria de reparo da célula e impedir o acesso da telomerase ao terminal dos cromossomos alongados (MUNOZ-JORDAN et al., 2001; TEIXEIRA e GILSON, 2005; GILSON e GELI, 2007). A figura 1 evidencia o arranjo em “t-loop” dos telômeros.

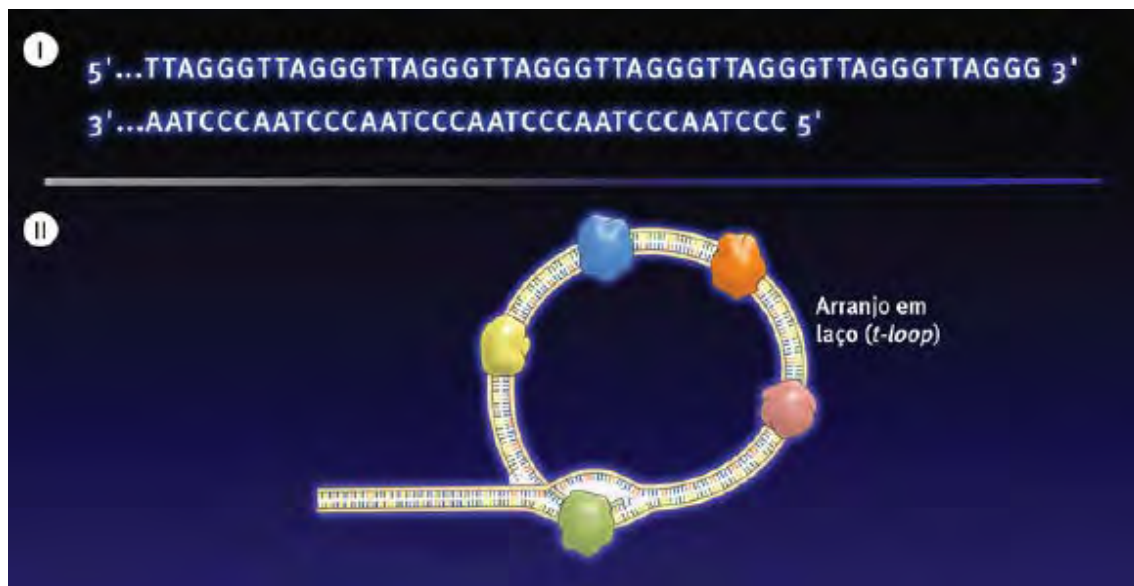


Figura 1. Os telômeros humanos apresentam uma sequência de nucleotídeos em que o terminal da fita mais longa do DNA (em cima) é rico em guanina (letra 'G'), e a fita mais curta (em baixo) é complementar à primeira e rica em citosina (letra 'C'). Os telômeros são encontrados com esse terminal 'livre' (I) ou formando um arranjo em laço (t-loop, em inglês) (II), presente nos cromossomos de alguns eucariotos (os corpos coloridos representam proteínas teloméricas que mantêm essa estrutura). (CANO, M. I. N., 2006)

1.2. Proteínas teloméricas e manutenção dos telômeros

Associadas aos telômeros e formando um grande complexo nucleoprotéico, estão inúmeras proteínas que coordenam a dinâmica da estrutura telomérica. Tais proteínas constituem um complexo protéico responsável por manter a estabilidade do telômero e também por regular o acesso da telomerase (DMITRIEV et al., 2003; AUBERT e LANDSORP, 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). Proteínas teloméricas podem ter associação direta ao DNA, a outras proteínas teloméricas, ou ainda ter associação a outros fatores, como os que compõem a maquinaria de reparo a danos ao DNA. As funções destas proteínas teloméricas variam, mas parecem estar associadas a região do telômero com a qual elas interagem. Complexos protéicos que se associam a fita simples do DNA telomérico participam no recrutamento da telomerase e influenciam a elongação telomérica. Por outro lado, complexos protéicos que se associam a fita dupla estão envolvidas na manutenção do t-loop e regulam a atividade da telomerase negativamente (DE LANGE, 2005; AUBERT e LANDSORP, 2008).

Em mamíferos o complexo multiprotéico de interação ao DNA telomérico, inicialmente denominado telossomo, é conhecido como *shelterin*, e recebeu esta denominação devido a sua função na proteção ao DNA telomérico (*shelter*, em inglês, escudo) (LIU, et al. 2004; DE LANGE, 2005). As proteínas que fazem parte do complexo shelterin possuem três características básicas: são abundantes nos telômeros mas não se acumulam em outras partes da célula, estão presentes nos telômeros ao longo de todo o ciclo celular e tem função limitada aos telômeros. Não pertencer a *shelterin*, no entanto, não indica que a proteína não possua função telomérica. Significa apenas que a proteína não apresenta alguma das características citadas acima (DE LANGE, 2005). A figura 2 apresenta uma representação esquemática da dinâmica de atuação do complexo *shelterin* em humanos.

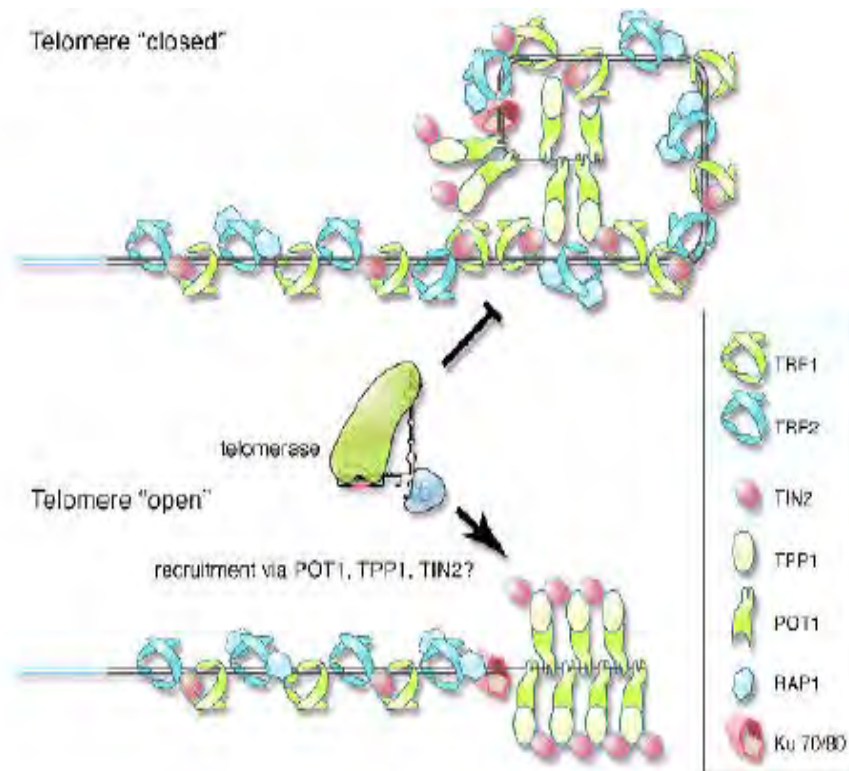


Figura 2. Complexo *shelterin* de humanos. A cromatina telomérica de mamíferos contém uma série de proteínas que interagem com DNA. Na forma de t-loop (telômero fechado) ou forma não-replicativa, as proteínas TPP1 e POT1 formam um complexo com o DNA telomérico via TIN2 e TRF1/2 e a telomerase tem seu acesso bloqueado aos telômeros. Na forma aberta ou forma replicativa, o complexo TPP1/POT1 recruta e estimula a atividade enzimática da telomerase em telômeros curtos (AUBERT e LANSDORP, 2008).

1.3. As proteínas TRF de mamíferos

Proteínas que ligam o DNA dupla ou simples-fita dos telômeros são componentes integrais do complexo telomérico e desempenham dois papéis fundamentais: regulação do comprimento dos mesmos, e proteção de sua extremidade (KANO et al., 2003). Em células mamíferas, dois parálogos, TTAGGG repeat-binding factor 1 (TRF1) e TRF2, ligam as repetições dupla-fita TTAGGG (CHONG et al., 1995, BIANCHI et al., 1997 FAIRALL et al., 2001). Ambas, TRF1 e TRF2 têm um motivo *myb* na porção C-terminal para ligação ao DNA (SMOGORZEWSKA et al., 2000) e um domínio, a montante, TRF de homologia (TRFH) para o homodimerização. Entretanto, na porção N-terminal são completamente diferentes: TRF1 é ácido, enquanto TRF2 é básico.

TRF1 de mamífero regula negativamente o comprimento dos telômeros com um caminho telomerase-dependente (VAN STEENSEL et al., 1997, KARLSEDER et al., 2002), enquanto foi visto que TRF2 está envolvida na regulação do comprimento do telômero e na proteção terminal telomérico (DE LANGE, 2002). A remoção da TRF2 dos telômeros por super-expressão de um mutante dominante negativo de TRF2 resultou em uma perda de 30% do terminal 3'G-overhang e fusão nos terminais dos cromossomos (SMOGORZEWSKA et al., 2002, VAN STEENSEL et al., 1998). Em levedura de fissão, Taz1, um homólogo de TRF (LI et al., 2000), liga o DNA dupla-fita do telômero (COOPER et al., 1997). Ele contém o motivo *myb* C-terminal e o motivo de homodimerização (SPINK et al., 2000). Está envolvido na regulação negativa do comprimento dos telômeros e na proteção dos terminais dos cromossomos (FERREIRA et al., 2001, MILLER et al., 2001). Similar ao caso com TRF2, a perda de Taz1 resultou em fusões NHEJ-mediadas do fim do cromossomo na fase G1 (FERREIRA et al., 2001), e Taz1 também promove a formação do t-loop 'in vitro' (TOMASKA et al., 2004).

A proteína ligante de DNA dupla-fita telomérico em Leveduras de brotamento é a Rap1 (LONGTINE et al., 1989). Embora Rap1 regule negativamente o comprimento dos telômeros e proteja as extremidades do cromossomo (CONRAD et al., 1990, MARCAND et al., 1997), não é um homólogo de TRF (LI et al., 2000). O único ortólogo de TRF em *Saccharomyces cerevisiae* é TBF1, que não é um componente integral do complexo telomérico de levedura, e seu papel na biologia dos telômeros ainda não está claro (BRIGATI et al., 1993, KOERING et al., 2000). Os complexos teloméricos de mamíferos e levedura de fissão contêm um ortólogo Rap1, mas este interage aos telômeros através da interação com TRF2 ou Taz1 (PARK et al., 2002).

1.4. Protozoários *Kinetoplastida*, família Trypanosomatidae

São caracterizados pela presença do cinetoplasto, que é uma organela especial bastante peculiar, apresentando morfologia fusiforme e sendo rica em DNA mitocondrial (kDNA) (SIMPSON, 1987).

Os genes desses parasitas não apresentam íntrons e são transcritos em grupos gerando RNAs precursores policistrônicos. 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 ocorra principalmente em nível pós-transcricional (STILES et al., 1999).

Os telômeros dos protozoários da ordem *Kinetoplastida*, em geral, estão descritos como repetições em *tandem* de sequências de 6 pb do tipo 5'-TTAGGG-3' (BLACKBURN & CHALLONER, 1984; VAN DER PLOEG et al., 1984; CHIURRILLO et al., 1999; FREITAS-JÚNIOR et al., 1999) e são idênticas à sequência dos telômeros de cromossomos humanos (MOYZIS et al., 1988).

Nesta monografia vamos tomar como exemplo os protozoários *Trypanosoma brucei* e *Leishmania spp.*, cujos homólogos da proteína TRF descrito em mamíferos foram melhor caracterizados.

1.5. *Trypanosoma brucei* e a tripanosomíase africana

Trypanosoma brucei é o agente causador da “*nagana*” em animais e da tripanosomíase africana conhecida popularmente como “doença do sono” em humanos. As formas infectivas do *Trypanosoma* (tripomastigotas metacíclicos) são transmitidas pela picada de um inseto chamado Glossina, conhecido como “mosca tsé-tsé”. A doença afeta principalmente populações pobres que vivem em áreas rurais da África sub-saariana. Após a picada da mosca infectada, o parasita se multiplica na linfa e no sangue causando dores de cabeça, febre, fraqueza, sudorese, dor nas articulações e rigidez. Ao longo do tempo ele atravessa a barreira hemato-encefálica e a migração para o sistema nervoso causa uma série de distúrbios neurológicos, incluindo distúrbios psiquiátricos, convulsões, coma e morte.

Pessoas infectadas podem ou não apresentar sinais da doença imediatamente. No caso de infecções por *T. brucei rhodesiense*, a doença é aguda, durando de algumas semanas a vários meses, enquanto que nas infecções por *T. brucei gambiense* a doença é crônica, geralmente com duração de vários anos sem grandes sinais ou sintomas. No entanto, em ambos os casos a chance de morte é grande quando não se faz o diagnóstico e tratamento adequados.

Indivíduos infectados se tornam uma fonte de infecção ao serem picados por moscas não infectadas. O parasita irá se multiplicar nas glândulas salivares da mosca que vai espalhar a infecção para a próxima pessoa sadia ao ser picada, fechando assim o ciclo de transmissão (figura 3).

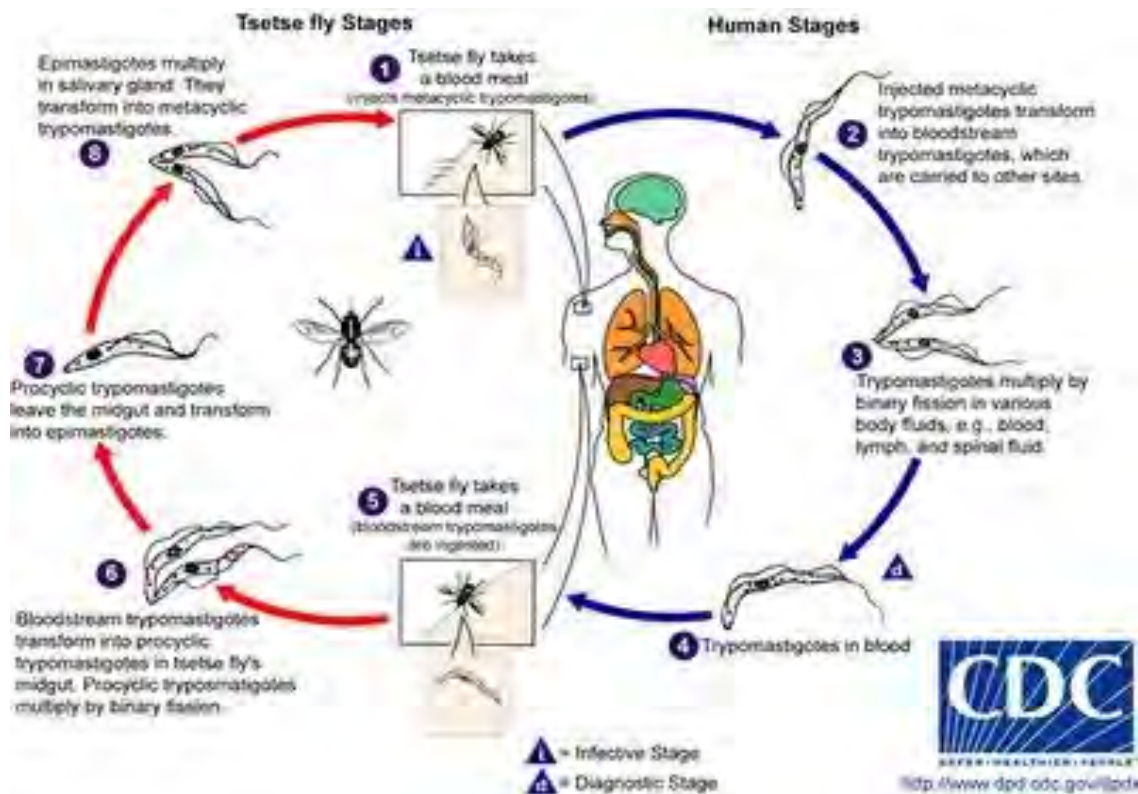


Figura 3. Ciclo biológico do parasita *Trypanosoma brucei*. Notar transformação das formas tripomastigotas sanguíneas, ingeridas pelo inseto durante o repasto sanguíneo no hospedeiro humano. No inseto, as formas sanguíneas se transformam em tripomastigotas procíclicos, depois em Epimastigotas e finalmente em tripomastigotas metacíclicos que é a forma infectiva para o homem. (CDC, 2003)

Animais domésticos ou selvagens também podem ser infectados pelo parasita e neste caso o quadro infeccioso se complica a ponto de que estes se tornam reservatórios do parasita. No caso de *T. brucei. rhodesiense*, o ciclo de transmissão envolve animais selvagens e domésticos, enquanto que em *T. brucei gambiense*, o ciclo é mais comum entre humanos, envolvendo em um grau bem menor os animais.

A OMS estima que no ano 2000 cerca de 50 a 60 milhões de pessoas na África foram expostas à picada da mosca tsé-tsé. Naquele tempo considerou-se que cerca de 300.000 pessoas foram afetadas pela doença, um valor que é muito maior do que os 27.000 casos diagnosticados e tratados naquele ano. Desde essa data muitos esforços de controle foram feitos e a população sob vigilância foi substancialmente aumentada. Em 2007, o número de novos casos já havia caído para 10.769. (WHO, 2000)

1.6. Biologia molecular e complexo telomérico em *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei é um protozoário parasita que causa a doença de sono nos seres humanos e o “nagana” no gado na África. Este parasita varia regularmente o gene “glicoproteína variante de superfície” (VSG) quando está em um hospedeiro mamífero, e essa variação ilude o sistema imune do hospedeiro (BARRY et al., 2001). Embora haja, aproximadamente, 1.000 genes de VSG e pseudogenes em *T. brucei* (VAN DER PLOEG et al., 1982), cada célula expressa um único VSG pelo sítio de expressão policistrônica (ES), situado na região subtelomérica e transcrito pela RNA polymerase I (GUNZL et al., 2003). Há aproximadamente 20 ESs (“expression sites”) (NAVARRO et al., 1996), mas somente 1 é ativo no momento. Todos ESs identificados tem estruturas similares, com o promotor localizado entre ~40 a ~60 kb a montante do telômero, seguido por diversos genes “sítios de expressão-associados”, terminando com o gene de VSG, que pode estar próximo até 2kb das repetições teloméricas (HORN et al., 2000, LIPS et al., 1993, PAYS et al., 1989). No trato da mosca tsé-tsé, os genes VSG não são transcritos e o VSG é substituído por membros da família de glicoproteínas de superfície em fase procíclica, cujos genes não teloméricos são transcritos igualmente pela RNA polymerase I.

O genoma de *T. brucei* consiste de 11 pares de cromossomos do tipo “mega-base” (0,9 para 5,7 Mb), alguns cromossomos intermediários (200 a 900 kb), e 100 minicromossomos (50 a kb 100), todos apresentando duas regiões teloméricas (PAYS et al., 1999). Os telômeros de *T. brucei* consistem nas repetições de TTAGGG, são mantidos pela telomerase (CANO et al., 1999), apresentam extremidades simples-fita *G-overhang* e formam t-loops (MUNOZ-JORDAN et al., 2001). Dos complexos multifuncionais mais conservados que são responsáveis pela manutenção dos telômeros em outros organismos, os homólogos Mre11 e Ku estão presentes nos tripanosomatídeos, e a deleção de uma ou outra subunidade do complexo Ku resulta no encurtamento telomérico (CONWAY et al., 2002, JANZEN et al., 2004, ROBINSON et al., 2002, TAN et al., 2002).

O fato que o gene VSG ativo está na região subtelomérica e a ocorrência do silenciamento dos outros genes teloméricos ocorrida em *T. brucei*, sugere que os telômeros possam desempenhar um papel na variação antigênica. Além disso, tripanosomatídeos divergiram de vertebrados algumas centenas de milhões de anos atrás (STEVENS et al., 1999), mas *T. brucei* e vertebrados ainda partilham muitas

semelhanças nas estruturas teloméricas, o que torna os tripanossomatídeos modelos interessantes para o estudo da biologia dos telômeros. As tentativas anteriores para identificar fatores ligantes de DNA telomérico identificaram uma aparente atividade, com grande afinidade, pela extremidade simples-fita G-overhang (CANO et al., 2002), e dois fatores apresentaram afinidade por sequências subteloméricas (EID et al., 1995, EID et al., 1997).

1.7. A proteína TRF em *Trypanosoma brucei* (TbTRF)

Recentemente, uma proteína homóloga à TRF2 de mamíferos foi identificada no genoma de tripanossomatídeos. Esta proteína conserva o domínio *myb-like* e apresenta similaridade com o domínio N-terminal de homodimerização TRFH quando comparada à TRF2 de humanos. Assim como a TRF2 de mamíferos, a TRF2 de *T. brucei* (TbTRF2) interage com o DNA telomérico formando um homodímero, sendo essencial para manutenção do terminal simples fita rico em G (LI et al, 2000). Porém, não existe nenhuma evidência experimental comprovando se esta proteína está relacionada com a regulação do ciclo celular, formação do “t-loops” ou cumpre alguma função em outra maquinaria de metabolismo do DNA, como a que repara danos em tripanossomatídeos.

1.8. *Leishmania* e leishmaniose

O gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, apresenta 13 espécies distintas de protozoários dentre as quais estão incluídos os agentes etiológicos da leishmaniose. Esses parasitas possuem ciclo de vida digenético (figura 4), em que há a 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 (NEVES, 2000; REY, 2002).

Durante o repasto sanguíneo a fêmea do inseto vetor introduz as formas infectivas, ou promastigotas metacíclicas, no hospedeiro mamífero, que são fagocitadas por macrófagos superficiais e no seu interior transformam-se em amastigotas. Estes amastigotas dividem-se causando a eventual lise do macrófago, e neste instante muitos amastigotas caem na corrente sanguínea e são novamente fagocitados por novas células do sistema monocítico fagocitário do hospedeiro (NEVES et al. 2000;).

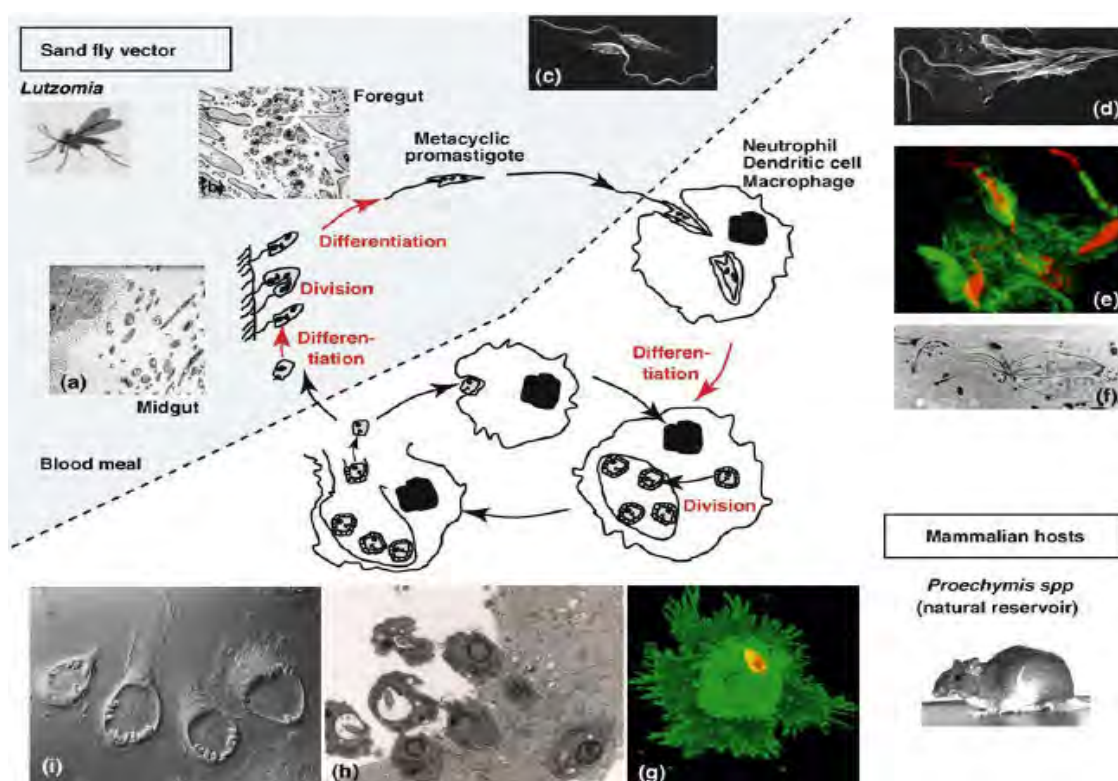


Figura 4. Ciclo biológico de *L. amazonensis* - Imagens bi e tridimensionais de amostras fixadas no interior do inseto vetor (*Lutzomia*) e em reservatório natural (*Proechymis* spp). (a) Promastigotas procíclicos no trato digestivo médio do inseto. (b) Promastigotas metacíclicos no trato digestivo anterior. (c) Promastigotas metacíclicos. (d, e, f, h, i) Macrófagos infectados. (g) Célula dendrítica infectada. (e, f) Promastigotas no fagolisossomo minutos após fagocitose. (f, h, i) Formação do vacúolo digestivo onde ocorre a transformação dos promastigotas metacíclicos em amastigotas e proliferação dos parasitas (LANG et al., 2009).

A leishmaniose se caracteriza por um conjunto de síndromes complexas e multifacetadas, causadas por diversas espécies do gênero *Leishmania*, podendo se manifestar nas formas visceral, mucocutânea e cutânea. A leishmaniose visceral ou calazar em que os parasitas apresentam acentuado tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM) do baço, do fígado, da medula óssea e dos tecidos linfóides. A leishmaniose mucocutânea apresenta complicações frequentes com o aparecimento de lesões destrutivas extensas nas mucosas do nariz, boca e faringe. Finalmente leishmanioses cutâneas produzem exclusivamente lesões cutâneas, ulcerosas ou não, porém de maneira restrita. Uma variação da leishmaniose cutânea é a forma cutânea difusa com disseminação cutânea que se apresenta em indivíduos anérgicos ou, tardiamente, em pacientes que haviam sido tratados de calazar (REY, 2002).

1.9. Biologia molecular e complexo telomérico em *Leishmania amazonensis*

Os parasitas do gênero *Leishmania* são organismos taxonomicamente primitivos, diplóides, que não apresentam ciclo sexuado de vida e cujos cromossomos não se condensam durante a mitose, o que dificulta qualquer tipo de análise citogenética. O tamanho do genoma nuclear haplóide é da ordem de 33-34 Mbp divididos entre aproximadamente 23-36 pares de cromossomos polimórficos (0,3 a 3,0 Mbp), os quais apresentam características espécie-específicas (WINCKER et al., 1996). Entre as peculiaridades da biologia molecular destes parasitas podemos ressaltar o “*trans-splicing*” do RNA mensageiro, a edição de RNAs mitocondriais, a duplicação gênica e a transcrição policistrônica dos genes (WIRTH, 1990).

A estrutura das regiões terminais dos cromossomos de *Leishmania* é similar à de outros eucariotos. Nas adjacências destas extremidades encontra-se a região subtelomérica denominada de LCTAS (“*Leishmania conserved telomere-associated sequence*”). Aí estão contidos blocos de sequências conservadas (CSB1 e CSB2), os quais são considerados sítios de ligação para proteínas teloméricas (FU & BARKER, 1998). Outros elementos subteloméricos não-conservados também ocorrem em *Leishmania*. Como exemplo podemos mencionar os quatro genes que codificam o *fosfoglicano scβ-galactosyltransferase* (SCG1, SCG5/7, SCG3 e SCG2/4/6), que são responsáveis por modificações de lipofosfoglicanos durante a diferenciação de promastigota para metacíclico no intestino do mosquito (DOBSON et al., 2006). Membros da família gênica SCG parecem estar envolvidos na “diferenciação de fase morfológica” do parasita, necessária para sobrevivência nos diferentes ambientes inóspitos que o mesmo transpõe durante a infecção nos mamíferos.

Em condições de estresse nutricional ou seleção por drogas, as *Leishmania* spp. podem amplificar segmentos específicos do genoma e transformá-los em minicromossomos. Apesar disso, os genomas das espécies do gênero *Leishmania* são muito similares entre si estando organizados em áreas centrais bem conservadas com polimorfismos concentrados nas extremidades dos cromossomos (STILES et al., 1999).

Em *Leishmania amazonensis* foi detectado a existência de três complexos protéicos que se associam in vitro ao DNA telomérico simples fita rico em G (FERNANDEZ et al., 2004). Em nosso laboratório, além da enzima telomerase (LaTERT), responsável pela elongação dos terminais cromossômicos, duas proteínas que compõem dois desses complexos foram identificadas utilizando-se métodos bioquímicos (CANO et al., 1999; GIARDINI et al., 2006). São elas as proteínas LaRBP38 (*Leishmania amazonensis* RNA

binding protein 38) e a proteína LaRPA-1 (*Leishmania amazonensis* Replication Protein A 1) (FERNANDEZ et al., 2004). Ambas também interagem e co-localizam com os telômeros do parasita in vivo (LIRA et al., 2007, SIQUEIRA NETO et al., 2007). Também foram identificadas proteínas que se associam in vitro e in vivo a dupla-fita telomérica. Entre elas estão LaTBP1 (*Leishmania amazonensis* Telomere Binding Protein 1), LaRBP38 (LIRA et al., 2007) e LaTRF (*Leishmania amazonensis* TTAGGG Repeat Binding Factor) (da SILVA et al., 2010). A Figura 5 apresenta o panorama atual da composição dos telômeros de *Leishmania amazonensis*.



Figura 5. Panorama atual dos telômeros de *Leishmania*. O DNA telomérico é composto por uma porção dupla-fita, formado pela repetição TTAGGG em tandem, sequências subteloeméricas (LCTAS - *Leishmania Conserved Telomere Associated Sequences*) e uma protrusão 3'-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 sequência telomérica.

1.10. A proteína TRF em *Leishmania amazonensis* (LaTRF)

Em nosso laboratório, a sequência homóloga de TRF de *L. amazonensis* (LaTRF, GenBank Acc. [EF559263](#)), foi clonada a partir de uma sequência putativa de *L. major* a qual compartilha similaridades com a TbTRF e com o domínio *myb-like* das TRF de vertebrados. O gene foi clonado, sequenciado e a análise *in silico* das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos mostrou que o gene *LaTRF* codifica uma proteína de aproximadamente 82,5 kDa, a qual compartilha similaridades com ambas proteínas TRF1 e TRF2 de vertebrados. LaTRF interage *in vitro* e *in vivo* com o DNA telomérico dupla fita e co-localiza com os telômeros de formas promastigotas do parasita (da

SILVA et al., 2010), porém seus interatores ou sua participação em outras maquinarias celulares, como a de reparo a danos no DNA, ainda são desconhecidos e a obtenção da proteína LaTRF recombinante poderá vir a ser uma ferramenta valiosa para se realizar essas análises *in vitro*.

1.11. Importância de uma caracterização funcional da proteína LaTRF

Desde 1980 a leishmaniose vem se espalhando por todas as regiões do Brasil, e dentre os 88 países que constituem regiões endêmicas para a leishmaniose, 76 são países em desenvolvimento, o que evidencia a íntima relação entre esta parasitose e os fatores sócio-econômicos dessas regiões. 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; ARIAS et al., 1996). Além disso, o composto tradicionalmente empregado para combater os parasitas, o antimonial pentavalente, pode causar vários efeitos colaterais nos pacientes, como dores musculares e alterações cardíacas. Por esses motivos, um maior conhecimento sobre a biologia celular e molecular destes protozoários poderá facilitar o descobrimento de novos alvos parasitas-específicos para o desenvolvimento de vacinas e drogas eficazes para a erradicação da doença. O parasita alvo deste estudo é a *Leishmania amazonensis*, agente causal da leishmaniose cutânea e cutânea-difusa apresentando ampla distribuição geográfica, encontrando-se por toda bacia amazônica, além de estados como Maranhão, Ceará, Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo (NEVES, 2000; REY, 2002). Porém, em algumas regiões do Brasil, *L. amazonensis* aparece como agente causal de todo o espectro da leishmaniose (BARRAL et al., 1991; ALMEIDA et al., 1996).

O Laboratório de Telômeros do Departamento de Genética da Universidade Estadual Paulista em Botucatu é pioneiro em pesquisas com telômeros de protozoários patogênicos, principalmente os causadores da leishmaniose em humanos e animais domésticos. O objetivo é encontrar meios de utilizar a telomerase e outras proteínas teloméricas (no caso deste estudo, LaTRF) como novos e potenciais alvos para o desenvolvimento de terapias antiparasitárias, incluindo o desenho de drogas de baixa toxicidade para o hospedeiro e mais eficazes no combate à doença. A leishmaniose, doença infecciosa transmitida pela picada de um inseto, pode se manifestar de diferentes formas clínicas e é mais grave em hospedeiros com o sistema imunológico enfraquecido. O número crescente de casos da doença em transplantados e em

portadores do vírus HIV tem alarmado as comunidades médica e científica. Além disso, a Organização Mundial da Saúde considera a leishmaniose uma das doenças cuja incidência mais cresce na atualidade (juntamente com a dengue e a malária), pois para ela não existem métodos eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento (CANO, 2006).

2. Objetivos

Este projeto tem como objetivo principal a expressão da proteína *TRF* de *L. amazonensis* (*LaTRF*) em vetor de expressão bacteriano (pMAL). Sendo assim, os objetivos específicos do projeto são: a clonagem do gene em vetor de clonagem TOPO-TA cloning, a subclonagem em vetor de expressão pMAL-c5x (NEB), a expressão da proteína recombinante em *E. coli*, e a purificação da mesma utilizando-se coluna de afinidade e clivagem da fusão (MBP + LaTRF) com fator Xa. Futuramente a proteína recombinante será utilizada para produção de soro específico o qual será utilizados em diferentes ensaios funcionais, por exemplo ensaios *in vitro* de interação proteína:DNA e “pull-down”.

3. Metodologia, plano de trabalho e forma de análise dos resultados

3.1. Cultura de parasitas

Formas promastigotas de *L. amazonensis*, cepa MHOM/BR/73/M2269, foram cultivadas em fase exponencial a 27°C em meio “199 (Earle)” (Cultilab), pH 7,4, suplementado com 5% de soro fetal bovino (Cultilab) e 1X solução de Antibióticos (penicilina/estreptomicina com antimicótico (Cultilab).

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

O DNA genômico foi extraído de promastigotas originados de culturas em fase exponencial de crescimento. Os parasitas foram separados do meio de cultura por centrifugação, lavados em tampão PBS (“Phosphate Buffer Saline” NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4) contendo 2% de glicose e sedimentados por centrifugação a 10.000 rpm por 30 segundos. Para proceder com a lise celular, os sedimentos foram suspensos em solução contendo 10 mM Tris-HCL pH 7,5, 5 mM EDTA pH 8,0, 100 mM cloreto de lítio e 0.1% Triton X-100. A mistura foi incubada por 5 min à temperatura ambiente com agitação suave, seguido de 2-3 extrações com fenol:clorofórmio (vol/vol) e fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e precipitação com etanol absoluto na presença de 0,3 M de acetato de sódio pH 5,2. Os ácidos nucleicos precipitados foram ressuspendidos em TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1mM pH 8,0) e tratados com 10 µg de RNase A por 15 min a 37°C, seguido de extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, precipitação do DNA com 0,3 M de acetato de sódio pH 5,2 e etanol absoluto e centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos. Os sedimentos foram lavados com 75% etanol gelado e suspensos em tampão TE. A

qualidade da extração e a concentração de DNA foram estimadas utilizando-se corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) em 0,5X TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) e por dosagem da DO 260 nm em espectrofotômetro com luz UV (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

3.3. Amplificação e purificação do inserto contendo o gene *LaTRF*

O DNA genômico de *L. amazonensis* foi utilizado como molde para amplificação do gene que codifica para a proteína LaTRF por reação de PCR. O gene *LaTRF2* foi amplificado através de iniciadores elaborados a partir da sequência gênica disponível no banco de dados públicos (GenBank acc.n. [EF559263](#)), utilizando-se como ferramenta o programa Gene Runner versão 3.05. Para facilitar a clonagem posterior em vetor de expressão pMAL-c5x (NEB), estes iniciadores continham sítios para enzimas de restrição nas suas extremidades 5', que também estarão presentes no sítio de policlonagem do vetor e ausentes na sequência do gene (por exemplo *NdeI* e *BamHI*). Isto facilitou a clonagem direcionada e na mesma fase de leitura do vetor. Os produtos de PCR correspondentes ao gene inteiro (*LaTRF*) foram analisados por eletroforese em gel de agarose, purificados utilizando-se kit de purificação (Perfectprep® Gel Cleanup kit - Eppendorf) e quantificados utilizando-se espectrofotometria de luz U.V.

3.4. Clonagem do inserto contendo o gene *LaTRF* no vetor de clonagem para produtos de PCR

Os produtos de PCR foram clonados em vetor de clonagem (pCR® 2.1 – TOPO, Invitrogen™). O sistema pCR® 2.1 – TOPO envolve não somente um vetor de clonagem, mas uma bactéria que serve de hospedeira para o vetor (*Escherichia coli* (*E. coli*) cepa DH5α) e que permitirá altos níveis de replicação do plasmídeo contendo o fragmento de interesse. Estas bactérias deverão apresentar condições fisiológicas especiais, ou seja, deverão estar aptas a receber o DNA plasmidial. Este estado fisiológico especial é denominado competência e pode ser produzido através do método de tratamento com cloreto de cálcio (CaCl₂) e variações bruscas de temperatura (Sambrook & Russel, 2001). Após a transformação, as mesmas foram plaqueadas em meio de cultura contendo ampicilina, X-gal e IPTG para seleção subsequente das colônias recombinantes. O X-gal é utilizado para detectar a atividade da β-galactosidade em colônias bacterianas. O IPTG é análogo à lactose e não é metabolizável pela β-galactosidade, é um indutor da transcrição do gene do operon lac presente no vetor de

clonagem. Assim, na presença de atividade da β -galactosidade as colônias tornam-se azuis e na ausência tornam-se brancas. A inserção do gene de interesse no sítio de policlonagem do plasmídeo interrompe a sequência do gene lacZ e abole a produção de β -galactosidade. Desta forma, na presença de X gal e IPTG, plasmídeos vazios apresentaram colônias azuis e plasmídeos com o inserto de interesse colônias brancas.

3.5. Checagem da clonagem por PCR de colônia e sequenciamento automático

Além de se verificar a cor das colônias, para checar o sucesso da clonagem foi realizado um PCR de colônia (Sambrook & Russel, 2001) utilizando os próprios iniciadores elaborados para amplificação do gene. Este processo de verificação do sucesso da clonagem (PCR de colônia) foi concluído através de análise do produto de PCR em gel de agarose. Confirmado o sucesso da clonagem, alguns recombinantes foram selecionados então para novo plaqueamento em meio de cultura contendo somente ampicilina. Foram realizadas extrações de DNA plasmidial em pequena escala (Mini prep) baseadas em protocolo pré-estabelecido (Sambrook & Russel, 2001), utilizando-se kit (Perfectprep[®], Plasmid Mini - Eppendorf), para verificação e análise dos produtos de interesse. Confirmado o sucesso, foram realizados os sequenciamentos. As reações de sequenciamento do gene que codifica para a proteína recombinante LaTRF foram realizadas com a utilização do kit “Big Dye Terminator v 3.0” (Applied Biosystems) conforme recomendado pelo fabricante, e os DNAs sequenciados no aparelho sequenciador ABI 377 (Applied Biosystems). Esta atividade foi realizada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em Campinas.

3.6. Subclonagem no vetor de expressão bacteriano pMAL-c5x

Inicialmente foi utilizado o vetor de expressão pMAL-c5x (New England BioLabs) (Figura 5), o qual permite que a proteína de interesse seja expressa, fusionada na sua região N-terminal, com a MBP (*Maltose Binding Protein*). O que facilita sua detecção, localização e purificação utilizando uma resina de amilose.

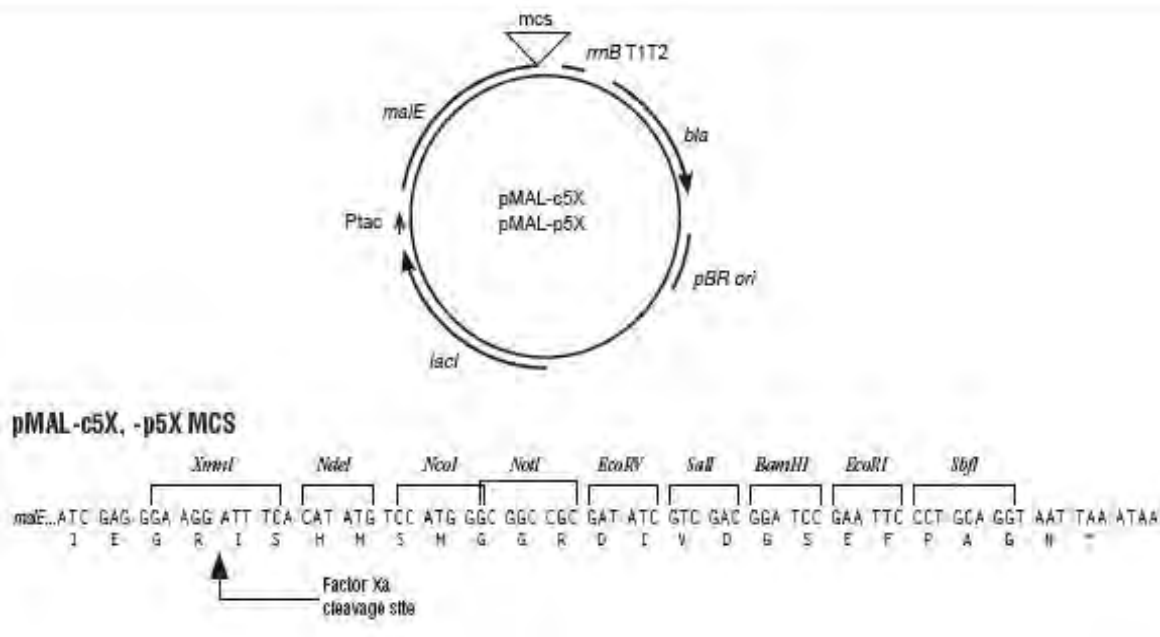


Figura 5. Mapa do vetor de expressão pMAL - este vetor contém origem de replicação bacteriana (pBR ori), gene que confere resistência a ampicilina (amp), promotor Ptac, possibilitando a indução da expressão da proteína recombinante por IPTG, gene lacI (codifica o repressor lac), gene rrnB terminator T1T2 (não deixa expressão interferir na replicação do plasmídeo), gene malE (codifica a MBP) e Polylinker contendo os sítios de restrição e o sítio de clivagem para o fator Xa (separa MBP da proteína de interesse).

3.6.1. Estratégia de clonagem: digestão, purificação e ligação do inserto no vetor de expressão pMAL-c5X

Para essa clonagem, retirou-se o inserto clonado no vetor TOPO por digestão com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. Da mesma forma o DNA plasmidial do vetor pMAL-c5X foi digerido com as mesmas enzimas presentes no *polylinker*. Como estes sítios não estão presente no gene *LaTRF*, não ocorrerá o corte dentro do mesmo permitindo que este se ligue na mesma fase de leitura do referido vetor de expressão, em um processo chamado ligação, realizado pela enzima T4 DNA ligase. Vale lembrar que antes da ligação, os produtos das digestões foram analisados em gel de agarose, os fragmentos de interesse foram purificados utilizando-se kit de purificação (Perfectprep®, Gel Cleanup – Eppendorf) e foi estimada a concentração dos DNAs utilizando-se leitura espectrofotométrica da DO_{260nm} .

3.6.2. Transformação bacteriana da construção pMAL + LaTRF

O sistema pMAL envolve não somente um vetor de expressão, mas uma bactéria geneticamente modificada que serve de hospedeira para o vetor (*E. coli* cepa BL21) e que permite altos níveis de expressão da proteína recombinante. A ligação foi plaqueada em meio LB sólido contendo ampicilina.

Para checagem da clonagem, foi realizado um PCR das colônias e dos clones recombinantes foram obtidos DNA plasmidial. Estes foram submetidos a sequenciamento para verificação da fase de leitura das sequências traduzidas. Uma vez confirmado o sucesso das clonagens procedemos com a expressão das proteínas conforme indicado no manual do fabricante do plasmídeo pMAL-c5x (New England BioLabs).

3.6.3. Testes de expressão para futura purificação da proteína recombinante LaTRF

A expressão da proteína recombinante foi verificada em análises de pequena escala através de induções com IPTG. A cultura contendo transformantes com o plasmídeo recombinante pMAL + LaTRF foi inoculada em meio LB líquido contendo glicose e a indução foi realizada pela adição de IPTG na concentração de 1mM após crescimento bacteriano com DO_{600nm} entre 0.4 e 0.6. A purificação da proteína recombinante será feita pela passagem do extrato protéico por uma resina de amilose em um processo descrito abaixo.

Como a MBP (Maltose Binding Protein) possui afinidade pela resina, somente esse complexo (MBP + LaTRF) será capturado. Após isso, será feita uma eluição com maltose livre, que por competição de afinidade, fará com que o complexo se desligue da resina.

Então, uma vez obtida a proteína recombinante em fusão com MBP, se procede com a clivagem da MBP por ação do fator Xa (protease). Para a purificação final, passa-se novamente a suspensão contendo a proteína em resina de amilose para que a MBP seja capturada e a proteína de interesse saia no “flow trough”. Após isso, a proteína recombinante passará por segunda coluna cromatográfica, coluna de exclusão, ex: sepharose, de forma a separar a LaTRF do fator Xa e de outros contaminantes.

Esse processo está esquematizado abaixo (Figura 6):

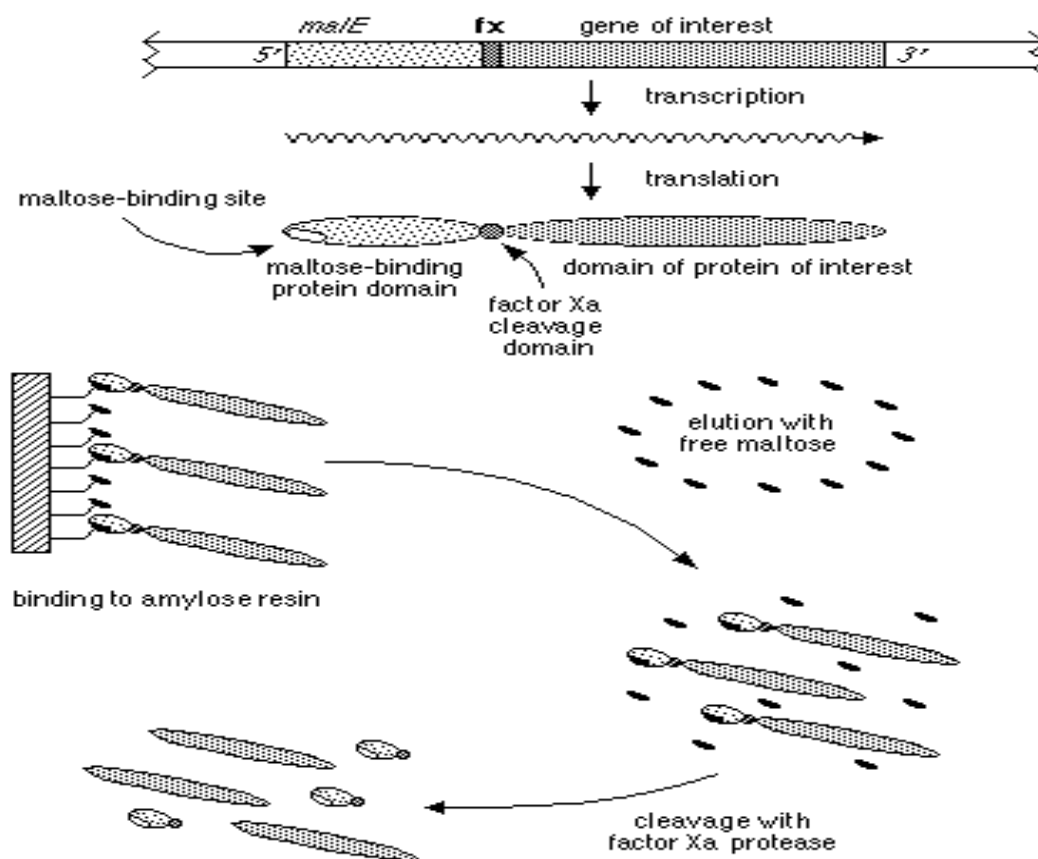


Figura 6. Expressão e Purificação de proteínas recombinantes utilizando o sistema pMAL – notar que o gene de interesse é fusionado ao gene *maltE* que codifica a MBP. É importante destacar também o sítio onde o fator Xa irá clivar essas duas proteínas na purificação.

3.7. Análise da expressão da proteína LaTRF utilizando SDS-PAGE seguido de “Western Blot” revelado com soros imunes específicos

Extratos protéicos da proteína recombinante LaTRF antes e após a purificação foram aplicados em géis de 10% (19% polyacrilamida: 1% acrilamida) 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 and Russel, 2001). A detecção

das proteínas foi realizada utilizando-se os soros antiMBP fornecido no kit do vetor (pMAL-c5x, NEB). A revelação foi feita utilizando-se o kit “Reagente Solução HPR para Detecção Quimiluminescente (MILLIPORE)”.

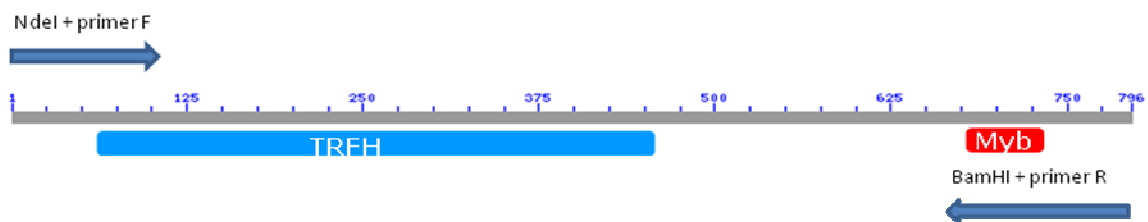
4. Resultados e discussão

4.1. Amplificação por PCR do gene *LaTRF* para subclonagem no vetor de expressão pMAL

O gene *LaTRF* (fragmento de DNA de 2,391 kb) foi amplificado através de iniciadores (“primers”) (figura 1) elaborados a partir da sequência gênica identificada no banco de dados públicos do projeto genoma de *L. major* (GenBank, Acc. [EF559263](#)), utilizando-se como ferramenta o programa Gene Runner versão 3.05. Esses produtos de PCR contém sítios de restrição (*NdeI* e *BamHI*) para a subclonagem em vetor de expressão pMAL-c5x (NEB).

Na Fig. 1B temos um gel de agarose mostrando a amplificação por PCR do gene *LaTRF* utilizando-se como molde o DNA do gene já clonado em vetor específico para produtos de PCR (TOPO) e os iniciadores mostrados na Fig. 1A. O fragmento amplificado tem o tamanho esperado de 2.4 kb, confirmando que a amplificação do gene teve sucesso.

A)



B)

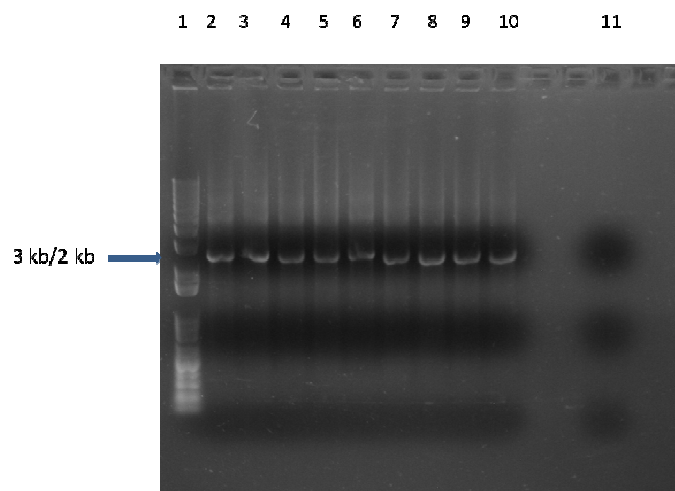


Fig. 1. Produtos da amplificação do gene *LaTRF* – TOPO fracionados em gel de agarose corado com EtBr. 1- Marcador de peso molecular *Ladder* 1kb (Invitrogen), 2 a 10- Produtos da amplificação do gene *LaTRF* com os iniciadores contendo os sítios de restrição para clonagem em pMAL, 11- C (-) controle negativo da reação de PCR realizada sem DNA.

4.2. Purificação dos produtos de PCR

De posse dos fragmentos de DNA obtidos por PCR, foram realizadas purificações (Fig.2) utilizando-se kit de purificação seguido da quantificação do DNA por espectrofotometria de luz U.V, DO_{260nm} . Na figura 2 podemos observar uma banda com aproximadamente 2.4 kb que representa o inserto contendo o gene *LaTRF* purificado mais os sítios de restrição *NdeI* e *BamHI* nas extremidades 5' e 3' do gene respectivamente.

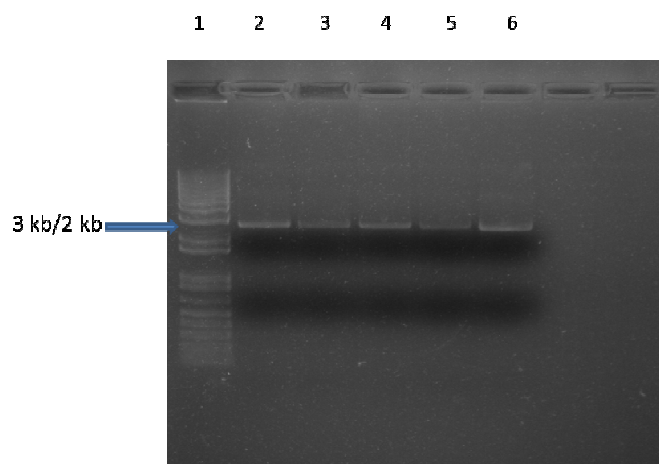


Fig. 2. Produtos da purificação do inserto contendo o gene *LaTRF* fracionados em gel de agarose corado com EtBr. 1- Marcador de peso molecular *Ladder* 1kb (Invitrogen), 2 a 6- insertos purificados.

4.3. Clonagem do gene *LaTRF* no vetor TOPO-TA cloning

Foi realizada uma clonagem dos fragmentos de DNA obtidos por PCR em vetor de clonagem para produtos de PCR (TOPO), seguindo as especificações do fabricante.

A Fig. 3 mostra uma placa de meio LB sólido contendo ampicilina, IPTG e X-gal na qual foram selecionadas colônias brancas contendo os clones (tópico 3.4 da metodologia). Já a figura 4 apresenta um gel de agarose 0,8% mostrando reações de PCR de colônia das construções *LaTRF*-TOPO, demonstrando assim que a clonagem no vetor TOPO foi realizada com sucesso.

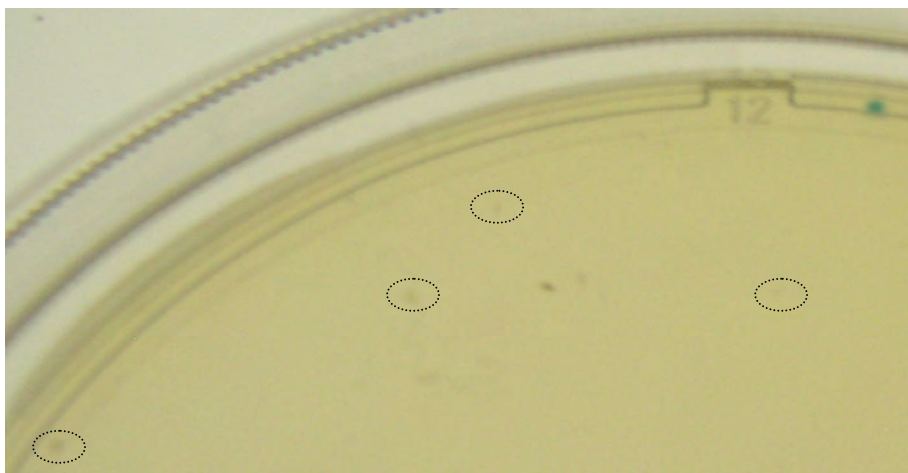


Fig. 3. Transformação bacteriana (linhagem DH5-alfa) do gene *LaTRF* clonado no vetor TOPO em placa de LB contendo ampicilina, IPTG e X-gal. A foto acima foi tirada de uma placa contendo colônias brancas (com inserto) e colônias azuis (sem a presença do inserto).

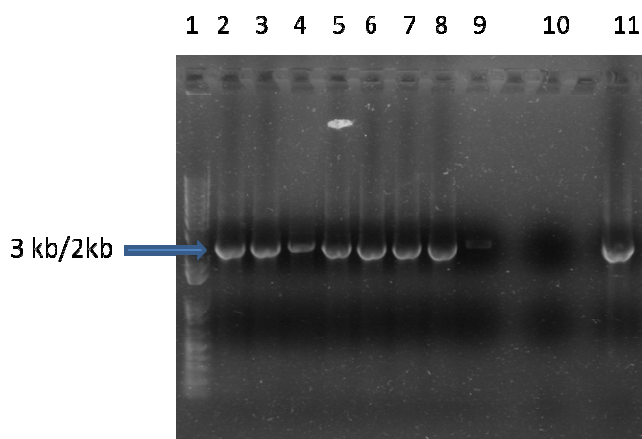


Fig. 4. Produtos da amplificação dos insertos de clones recombinantes *LaTRF*-TOPO fracionados em gel de agarose corado com EtBr. Insertos obtidos a partir de colônias brancas (2 a 9). 1- Marcador de peso molecular *Ladder* 1kb (Invitrogen), 2 a 9- gene *LaTRF* ligado no vetor TOPO, 10- C (-) controle negativo da reação de PCR realizada sem DNA, 11- C (+) controle positivo da reação de PCR realizada.

4.4. Extração plasmidial em pequena escala da ligação *LaTRF*-TOPO

Com o sucesso da clonagem no vetor pCR 2.1 – TOPO confirmado, extrações de DNA plasmidial em pequena escala (Mini prep) foram realizadas para verificação e análise dos produtos de interesse. Na figura 5 podemos visualizar várias bandas mostrando as várias formas que um DNA circular (*LaTRF*-TOPO) pode apresentar quando fracionado em gel de agarose (relaxado, enrolado e superenrolado).

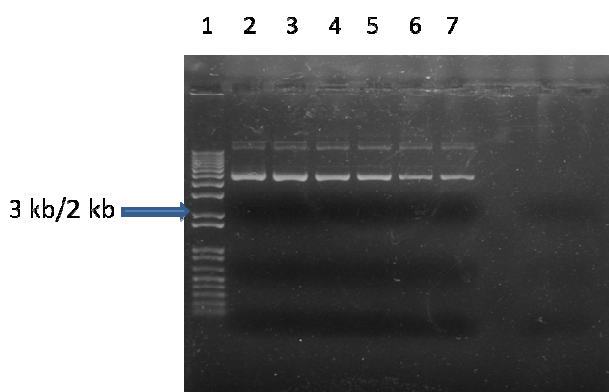


Fig. 5. Gel de agarose corado com EtBr contendo DNA plasmidial obtido de mini-prep da ligação *LaTRF*-TOPO. 1- Marcador de peso molecular *Ladder* 1kb, 2 a 7- plasmídeos recombinantes *LaTRF*-TOPO.

4.5. Suclonagem do gene *LaTRF* em vetor de expressão pMAL-c5x

Para a subclonagem de *LaTRF* no vetor de expressão, foram feitas digestões do DNA plasmidial *LaTRF*-TOPO e do vetor pMAL-c5x utilizando-se as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* para a linearização dos mesmos.

A figura 6 mostra a purificação do vetor pMAL-c5x linearizado e do inserto *LaTRF* contendo os sítios de restrição *NdeI* e *BamHI* nas suas extremidades. Assim, a ligação do mesmo no respectivo vetor está pronta para ser realizada de forma direcionada e que a proteína *LaTRF* seja expressa em fusão com a MBP (*Maltose binding protein*).

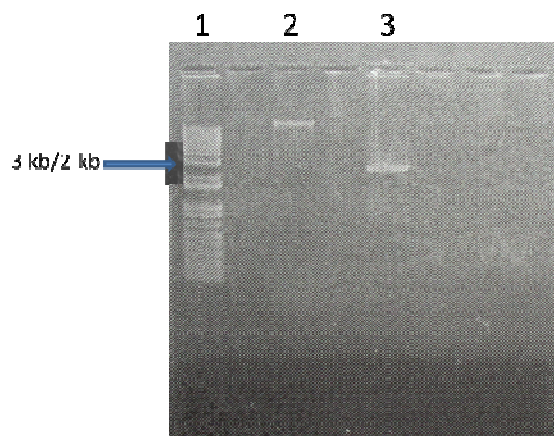


Fig. 6. Produtos da purificação do vetor pMAL-c5x (NEB) e do inserto contendo o gene *LaTRF* fracionados em gel de agarose 0.8% corado com EtBr. 1- Marcador de peso molecular *Ladder* 1kb, 2- vetor pMAL-c5x linearizado e purificado, 3- inserto *LaTRF* purificado.

A subclonagem do gene *LaTRF* no vetor de expressão bacteriano (pMAL-c5x, NEB) permite, que a fusão ocorra na extremidade N-terminal, a qual facilita o processo de purificação da mesma por cromatografia de afinidade em colunas de amilose como esquematizado na Metodologia (tópico 3.6.3).

A confirmação desta clonagem foi feita por reação de PCR de colônia, utilizando-se os mesmos iniciadores usados na clonagem do gene no vetor TOPO. As colônias recombinantes foram obtidas da transformação da ligação pMAL-c5x + *LaTRF*. A figura 7 confirma a construção na qual o plasmídeo recombinante foi designado *LaTRF* pMAL.

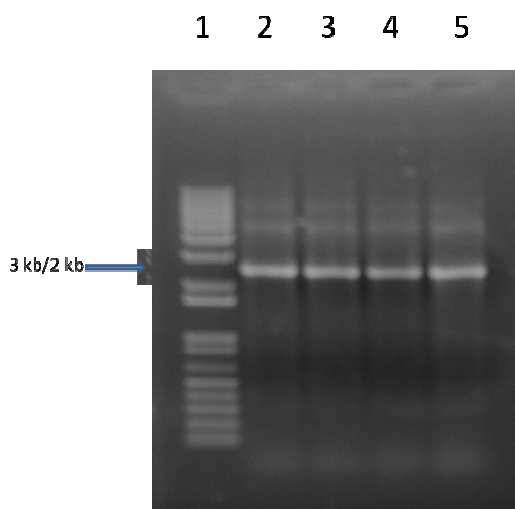


Fig. 7. Produtos da amplificação de clones recombinantes contendo o gene *LaTRF* clonado no vetor pMAL-c5x, fracionados em gel de agarose corado com EtBr. 1- *Ladder* 1 kb, 2 a 5- gene *LaTRF* ligado no vetor pMAL-c5x.

4.6. Teste da expressão em pequena escala da proteína recombinante rLaTRF em fusão com a MBP

Após a obtenção do plasmídeo recombinante denominado *LaTRF* pMAL, prosseguiu-se com a transformação do mesmo em bactéria *E. coli* (NEB Express - kit pMAL-5x, NEB) adequada para expressão.

Como especificado na Metodologia (tópico 3.6.3), a expressão da proteína LaTRF ocorre com a fusão da mesma à MBP (Maltose Binding Protein). Isso foi verificado utilizando análises em gel SDS-PAGE e “Western Blot”.

A figura 8 mostra um fracionamento de extratos bacterianos totais em gel SDS-PAGE 10% corado com “Coomassie blue”, representando uma análise da possível expressão da proteína recombinante rLaTRF em fusão com a MBP. A expressão da proteína foi induzida a partir de uma cultura de 100 ml e com 1 mM IPTG. A indução da expressão foi nos tempos de 1h, 2h, 3h, 4h, e *overnight*. Observou-se a presença de uma banda por volta de 125 kDa nos extratos bacterianos induzidos com IPTG que sugere que ocorreu a expressão da proteína rLaTRF em fusão com MBP, uma vez que esta banda corresponde a soma do peso molecular estimado para a LaTRF que é de 82,5 kDa mais o peso molecular estimado para a MBP que é de 43 kDa, totalizando 125,5 kDa. Também apareceram bandas ao redor de 43 kDa sugerindo somente a expressão da proteína MBP. Nota-se que a banda de 125,5 kDa só aparece nos extratos celulares obtidos de culturas induzidas com IPTG Fig. 8 (linhas 3-7).

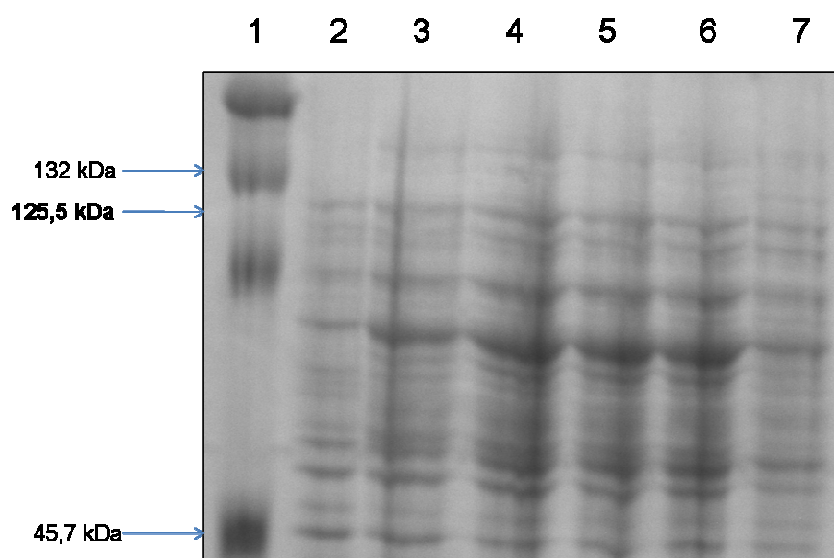


Fig. 8. Proteínas obtidas de extrato bacteriano fracionadas em gel SDS-PAGE 10% corado com “Coomassie blue”. Testes de expressão em pequena escala da proteína recombinante rLaTRF + MBP. 1- Marcador de peso molecular de proteínas Kaleidoscópio (BioRad), 2- extrato protéico total obtido de bactérias não-induzidas, 3 a 7- extratos protéicos obtidos de bactérias induzidas com 1mM IPTG nos tempos de 1h, 2h, 3h, 4h e *overnight*.

A figura 9 mostra outro gel SDS-PAGE 10% corado com “Coomassie blue” de uma análise também em pequena escala da purificação por afinidade da proteína recombinante utilizando resina de amilose (tópico 3.6.3 da Metodologia). Observam-se bandas de aproximadamente 125,5 kDa nos extratos protéicos de células induzidas *overnight* com 1 mM IPTG. Foram analisadas as frações solúveis (sobrenadante) e insolúveis (*pellet*) do extrato (Fig. 9, linhas 4 e 5), assim como dessas frações após purificação na resina de amilose (Fig. 9, linhas 6 e 7). Os resultados sugerem que a fração insolúvel contém a maior parte da proteína recombinante em fusão com a MBP. As linhas 2 e 3 contêm proteínas totais obtidas de extrato bacteriano induzido depois de 4h e *overnight*.

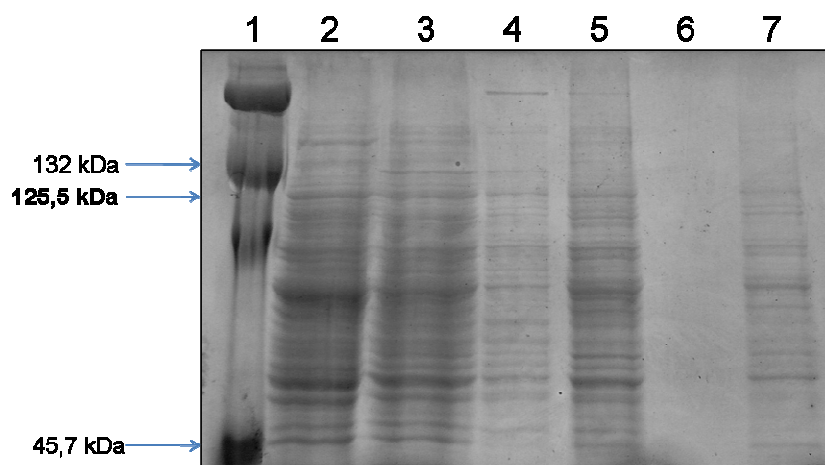


Fig. 9. Gel SDS-PAGE 10% corado com “Coomassie blue” mostrando uma análise em pequena escala da purificação realizada pelo sistema bacteriano pMAL. 1- Marcador de peso molecular de proteínas Kaleidoscópio (BioRad), 2- proteínas totais obtidas de extrato bacteriano induzido por 4h, 3- proteínas totais obtidas de extrato bacteriano induzido *overnight*, 4- Fração solúvel (sobrenadante) do extrato proteico de bactérias induzidas *overnight*, 5- Fração insolúvel (“pellet”) do extrato proteico de bactérias induzidas *overnight*, 6- Eluato obtido após a purificação da fração solúvel em resina de amilose, 7- Eluato obtido após a purificação da fração insolúvel em resina de amilose.

Para confirmar estes resultados, as frações protéicas totais foram submetidas a ensaio de “Western Blot” revelado com soro anti-MBP. O soro imune específico anti-MBP, deve teoricamente reconhecer a proteína de fusão com a MBP e a MBP.

Os resultados mostrados na Fig. 10, sugerem provavelmente que as bandas de ~125,5 kDa e de 43 kDa correspondam respectivamente a proteína rLaTRF+MBP e a MBP, uma vez que o soro não reconheceu nenhuma proteína no extrato proteico obtido de culturas não induzidas (Fig. 10, linha 1) e reconheceu especificamente o controle positivo, a proteína MBP (Fig. 10, linha 7) fornecida pelo kit e a MBP que aparece nos extratos induzidos nos tempos de 1h-4h (Fig. 10, linhas 2-6).

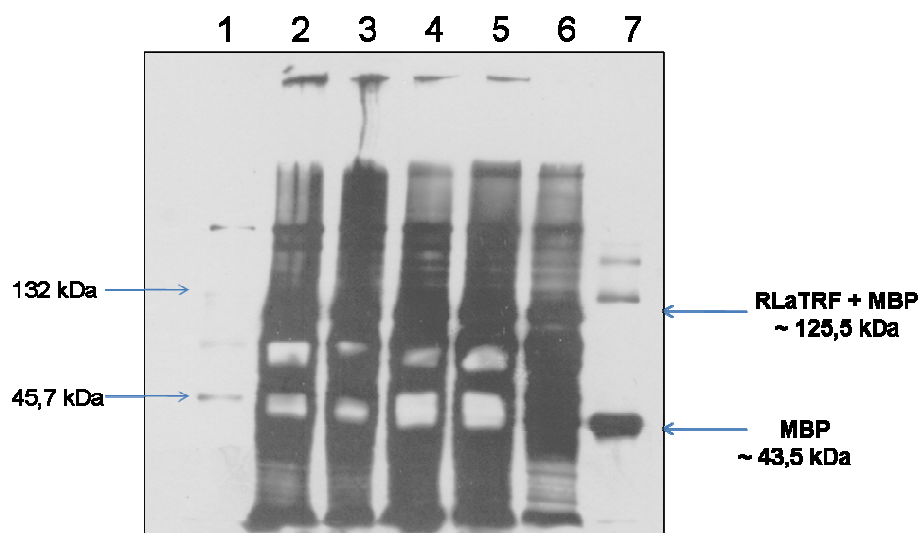


Fig. 10. Western Blot de extratos protéicos revelados com soro anti-MBP. 1- proteínas obtidas de extrato bacteriano não-induzido, 2 a 6- proteínas obtidas de extrato bacteriano induzido com 1 mM IPTG na concentração nos tempos de 1h, 2h, 3h, 4h e *overnight*. 7- controle positivo contendo somente amostra com a proteína MBP.

5. Conclusão

Pelos resultados obtidos neste estudo, a análise da expressão em pequena escala da proteína recombinante fornece indícios importantes de que é possível que a proteína telomérica LaTRF tenha sido expressa fusionada com a MBP (Maltose Binding Protein). Assim, esse sistema de expressão bacteriano (pMAL, NEB) pode representar uma importante ferramenta para a futura expressão em larga escala da proteína recombinante LaTRF assim como sua purificação e até a obtenção de soro imune específico. Até por que, a obtenção da proteína LaTRF recombinante em grande quantidade e com elevado grau de pureza facilitará estudos futuros sobre a forma de interação desta proteína com o DNA telomérico, assim como a identificação de suas prováveis proteínas parceiras por ensaio de “pull-down” seguido de identificação dos interatores por espectrometria de massa. Desta forma, iremos compreender melhor parte de suas funções na replicação e manutenção dos telômeros do parasita.

Referências Bibliográficas

- ALEXANDRE, S., M. GUYAUX, N. B. MURPHY, H. COQUELET, A. PAYS, M. STEINERT, AND E. PAYS. 1988. Putative genes of a variant-specific antigen gene transcription unit in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* **8**:2367–2378.
- ALMEIDA, R.P., et al., Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. *Am J Trop Med Hyg*, 1996. 54(2): p. 178-184.
- ARIAS, J., MONTEIRO, P., ZICKER, F. (1996). The reemerge of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emm. Infect. Dis.*, 2: 145-146.
- AUBERT, G. e LANSDORP, P.M. (2008). Telomeres and Aging. *Physiol. Rev.* **88**, 557-579.
- BARRAL, A., PEDRAL-SAMPAIO, D., GRIMALDI JUNIOR, G., et al. (1991). Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* **44**, 536-546.
- BARRY, J. D., AND R. MCCULLOCH. 2001. Antigenic variation in trypanosomes: enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite. *Adv. Parasitol.* **49**:1–70.
- BIANCHI, A., S. SMITH, L. CHONG, P. ELIAS, AND T. DE LANGE. 1997. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J.* **16**:1785–1794.
- BILAUD, T., C. BRUN, K. ANCELIN, C. E. KOERING, T. LAROCHE, AND E. GILSON. 1997. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat. Genet.* **17**:236–239.
- BLACKBURN, E. H., AND P. B. CHALLONER. 1984. Identification of a telomeric DNA sequence in *Trypanosoma brucei*. *Cell* **36**:447–457.
- BLACKBURN, E.H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 106: 661-673.
- BRIGATI, C., S. KURTZ, D. BALDERES, G. VIDALI, AND D. SHORE. 1993. An essential yeast gene encoding a TTAGGG repeat-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **13**:1306–1314.
- BROCCOLI, D., A. SMOGORZEWSKA, L. CHONG, AND T. DE LANGE. 1997. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat. Genet.* **17**:231–235.
- CANO, M. I. N., J. J. BLAKE, E. H. BLACKBURN, AND N. AGABIAN. 2002. A *Trypanosoma brucei* protein complex that binds G-overhangs and co-purifies with telomerase activity. *J. Biol. Chem.* **277**:896–906.
- 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.
- CANO, M.I.N. (2006). A vida nos terminais dos cromossomos. *Ciência Hoje*, **39**, 16-23.
- CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2003.

- CHIURRILLO, M.A., CANO, M.I., FRANCO, J.S., RAMIREZ, J.L.** (1999). Organization of telomeric and subtelomeric regions of chromosomes from the protozoa parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 100: 173-183.
- CHONG, L., B. VAN STEENSEL, D. BROCCOLI, H. ERDJUMENT-BROMAGE, J. HANISH, P. TEMPST, AND T. DE LANGE.** 1995. A human telomeric protein. *Science* **270**:1663–1667.
- CONRAD, M. N., J. H. WRIGHT, A. J. WOLF, AND V. A. ZAKIAN.** 1990. RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* **63**:739–750.
- CONWAY, C., R. MCCULLOCH, M. L. GINGER, N. P. ROBINSON, A. BROWITT, AND J. D. BARRY.** 2002. Ku is important for telomere maintenance, but not for differential expression of telomeric VSG genes, in African trypanosomes. *J. Biol. Chem.* **277**:21269–21277.
- COOPER, J. P., E. R. NIMMO, R. C. ALLSHIRE, AND T. R. CECHE.** 1997. Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature* **385**:744–747.
- 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..** The *Leishmania amazonensis* TRF (TTAGGG repeat-binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres. *BMC Microbiology* 2010, **10**:136
- de LANGE, T.** (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Dev.* 19:2100–2110
- de LANGE, T.** 2002. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* **21**:532–540.
- DMITRIEV, P. V., PETROV, A. V. & DONTSOVA, O. A. (2003).** Yeast telosome complex: components and their functions. *Biochemistry (Mosc)* **68**, 718-734.
- DOBSON, D.E.** et al. (2006) Genomic organization and expression of the expanded *SCG/L/R* gene family of *Leishmania major*: internal clusters and telomeric localization of *SCGs* mediating species-specific LPG modifications. *Mol. Biochem. Parasitol.* 146, 231-241
- EID, J. E., AND B. SOLLNER-WEBB.** 1995. ST-1, a 39-kilodalton protein in *Trypanosoma brucei*, exhibits a dual affinity for the duplex form of the 29-base-pair subtelomeric repeat and its C-rich strand. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 389–397.
- EID, J. E., AND B. SOLLNER-WEBB.** 1997. ST-2, a telomere and subtelomere duplex and G-strand binding protein activity in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **272**:14927–14936.
- FERNÁNDEZ, M.F., CASTELLARI, R.R, CONTE, F.F., GOZZO, F.C., SABINO, A.A., PINHEIRO, H., NOVELLO, J.C., EBERLIN, M.N., CANO, M.I.N.** (2004). Identification of three proteins that associate in vitro with the *Leishmania amazonensis* G-rich telomeric strand. *Eur J Biochem*, 271:3050-63.
- FERREIRA, M. G., AND J. P. COOPER.** 2001. The fission yeast Taz1 protein protects chromosomes from Ku-dependent end-to-end fusions. *Mol. Cell* **7**:55–63
- FREITAS-JUNIOR, IH, BOTTIUS, E., PIRRI, IA. DEITSCH, KW., SCHEIDIG, C., GUINET, F., NEHRBASS, U., WELLEMS, TE., SCHERF, A.** (2000). Frequent ectopic

- recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum* *Nature* 407: 1018-1022.
- FU, G. & BARKER, D.** (1998). Characterisation of *leishmania* telomeres reveals unusual telomeric repeats and conserved telomere-associated sequence. *Nuc. Ac. Res.*, **26**: 2161-2167.
- GIARDINI, M.A., LIRA, C.B.B., CONTE, F.F., CAMILLO, L.R., SIQUEIRA NETO, J.L., RAMOS, C.H.I. & CANO, M.I.N.** (2006) The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: gene cloning and characterization. *Parasitol. Res.* 14:1-8.
- GILSON, E. & GELI, V.** (2007). How telomeres are replicated. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 825-838.
- GUNZL, A., T. BRUDERER, G. LAUFER, B. SCHIMANSKI, L. C. TU, H. M. CHUNG, P. T. LEE, AND M. G. LEE.** 2003. RNA polymerase I transcribes procyclin genes and variant surface glycoprotein gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot. Cell* **2**:542–551.
- HORN, D., AND G. A. M. CROSS.** 1997. Analysis of *Trypanosoma brucei* vsg expression site switching *in vitro*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **84**:189–201.
- HORN, D., C. SPENCE, AND A. K. INGRAM.** 2000. Telomere maintenance and length regulation in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **19**:2332–2339.
- JANZEN, C. J., F. LANDER, O. DREESEN, AND G. A. M. CROSS.** 2004. Telomere length regulation and transcriptional silencing in KU80-deficient *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* **32**:6575–6584.
- KANO, J., AND F. ISHIKAWA.** 2003. Composition and conservation of the telomeric complex. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**:2295–2302.
- KARLSEDER, J., A. SMOGORZEWSKA, AND T. DE LANGE.** 2002. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* **295**:2446–2449.
- 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.
- KOERING, C. E., G. FOUREL, E. BINET-BRASSELET, T. LAROCHE, F. KLEIN, AND E. GILSON.** 2000. Identification of high affinity Tbf1p-binding sites within the budding yeast genome. *Nucleic Acids Res.* **28**:2519–2526.
- LANG, T., LECOEUR, H. e PRINA, E.** (2009). Imaging Leishmania development in their host cells. *Trends Parasitol* **25**, 464-473.
- LI, B., S. OESTREICH, AND T. DE LANGE.** 2000. Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* **101**:471–483.
- LIPS, S., P. REVELARD, AND E. PAYS.** 1993. Identification of a new expression site-associated gene in the complete 30.5 kb sequence from the AnTat 1.3A variant surface protein gene expression site of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **62**:135–138.

- LIRA, C. B., DE SIQUEIRA NETO, J. L., KHATER, L., CAGLIARI, T. C., PERONI, L. A., DOS REIS, J. R., RAMOS, C. H. & CANO, M. I. (2007a).** 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.
- LIU D, O'CONNOR MS, QIN J, SONGYANG Z. (2004)** Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *J Biol Chem.*279, 51338-42.
- LONGTINE, M. S., N. M. WILSON, M. E. PETRACEK, AND J. BERMAN. 1989.** A yeast telomere binding activity binds to two related telomere sequence motifs and is indistinguishable from RAP1. *Curr. Genet.* **16**:225–239.
- MARCAND, S., E. GILSON, AND D. SHORE. 1997.** A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* **275**:986–990.
- MILLER, K. M., AND J. P. COOPER. 2003.** The telomere protein Taz1 is required to prevent and repair genomic DNA breaks. *Mol. Cell* **11**:303–313.
- .MUNOZ-JORDAN, J., G. A. M. CROSS, T. DE LANGE, AND J. D. GRIFFITH. 2001.** T-loops at trypanosome telomeres. *EMBO J.* **20**:579–588.
- NAVARRO, M., AND G. A. M. CROSS. 1996.** DNA rearrangements associated with multiple consecutive directed antigenic switches in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* **16**:3615–3625.
- NEVES, D.P., MELO, A.L., GENARO, O. & LINARDI, P.M. (2000).** *Parasitologia Humana*. 10a Edição, Ed. Atheneu, pp. 31-72.
- PARK, M. J., Y. K. JANG, E. S. CHOI, H. S. KIM, AND S. D. PARK. 2002.** Fission yeast Rap1 homolog is a telomere-specific silencing factor and interacts with Taz1p. *Mol. Cells* **13**:327–333.
- PAYS, E., P. TEBABI, A. PAYS, H. COQUELET, P. REVELARD, D. SALMON, AND M. STEINERT. 1989.** The genes and transcripts of an antigen expression site from *T. brucei*. *Cell* **57**:835–845.
- PAYS, K., S. E. MELVILLE, AND K. GULL. 1999.** Nuclear and genome organization in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Today* **15**:58–63.
- REY. L. (2002)** *Parasitologia*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 214-266.
- ROBINSON, N. P., R. MCCULLOCH, C. CONWAY, A. BROWITT, AND J. D. BARRY. 2002.** Inactivation of Mre11 does not affect VSG gene duplication mediated by homologous recombination in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **277**: 26185–26193.
- SIMPSON, L. (1987).** The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol* **41**, 363-382.
- SIQUEIRA-NETO, J. L., LIRA, C. B., GIARDINI, M. A. & OTHER AUTHORS (2007).** *Leishmania* replication protein A-1 binds in vivo single-stranded telomeric DNA. *Biochem Biophys Res Commun* **358**, 417-423.
- SMOGORZEWSKA, A. & de LANGE, T. (2004)** Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 177–208.

- SMOGORZEWSKA, A., B. VAN STEENSEL, A. BIANCHI, S. OELMANN, M. R. SCHAEFER, G. SCHNAPP, AND T. DE LANGE.** 2000. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell. Biol.* **20**:1659–1668
- SMOGORZEWSKA, A., J. KARLSEDER, H. HOLTGREVE-GREZ, A. JAUCH, AND T. DE LANGE.** 2002. DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2. *Curr. Biol.* **12**:1635.
- SPINK, K. G., R. J. EVANS, AND A. CHAMBERS.** 2000. Sequence-specific binding of Taz1p dimers to fission yeast telomeric DNA. *Nucleic Acids Res.* **28**:527–533.
- STEWART, S. A. & 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., MEADE, J.C.** (1999). Genomic Organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **93**: 781-807.
- TAN, K. S., S. T. LEAL, AND G. A. M. CROSS.** 2002. *Trypanosoma brucei* MRE11 is non-essential but influences growth, homologous recombination and DNA double-strand break repair. *Mol. Biochem. Parasitol.* **125**:11–21.
- TEIXEIRA, M. T. & GILSON, E. (2005).** Telomere maintenance, function and evolution: the yeast paradigm. *Chromosome Res* **13**, 535-548.
- TOMASKA, L., S. WILLCOX, J. SLEZAKOVA, J. NOSEK, AND J. D. GRIFFITH.** 2004. Taz1 binding to a fission yeast model telomere: formation of telomeric loops and higher order structures. *J. Biol. Chem.* **279**:50764–50772.
- VAN DER PLOEG, L. H. T., A. Y. C. LIU, AND P. BORST.** 1984. Structure of the growing telomeres of trypanosomes. *Cell* **36**:459–468.
- VAN DER PLOEG, L. H., D. VALERIO, T. DE LANGE, A. BERNARDS, P. BORST, AND F. G. GROSVELD.** 1982. An analysis of cosmid clones of nuclear DNA from *Trypanosoma brucei* shows that the genes for variant surface glycoproteins are clustered in the genome. *Nucleic Acids Res.* **10**:5905–5923
- VAN STEENSEL, B., A. SMOGORZEWSKA, AND T. DE LANGE.** 1998. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **92**:401–413.
- VAN STEENSEL, B., AND T. DE LANGE.** 1997. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* **385**:740–743.
- WHO – World Health Organization (2000).** WHO report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases. WHO/CDS/CSR/ISR/2000.1.
- WHO EXPERT COMMITTEE (1990).** Control of the leishmaniasis. World health organization, Geneva. *Technical report Series* ; 793.
- 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.
- WIRTH, D.** (1990). Molecular Biology of *Leishmania*. In: *Modern Parasite Biology*, ed. Wyler, D., Freeman, W. and Co., New York, pp. 348-361.

APOIO:

