

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Maribel Fernández Fernández

"Identificação e caracterização de proteínas que se associam *in vitro* à fita telomérica rica em G de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*"

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do título de Doutor em
Genética e Biologia Molecular na área de
Genética de Microorganismos

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano

Campinas-SP.

2004

BANCA EXAMINADORA:

- Profª. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano (Orientadora) _____

Assinatura

- Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin _____

Assinatura

- Profª. Dra. Irene da Silva Soares _____

Assinatura

- Prof. Dr. José Franco da Silveira Filho _____

Assinatura

- Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo _____

Assinatura

- Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos _____

Assinatura

- Profª. Dra. Bianca Silvana Zingales _____

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano pela orientação e pelos conhecimentos transmitidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Também com profunda gratidão gostaria destacar a ajuda generosa de todos aqueles professores, colegas e amigos que contribuíram de forma direta ou indireta com a realização deste trabalho, todos colaboraram e brindaram-me seu tempo e sua experiência. Não os menciono individualmente para evitar alguma omissão involuntária.

Agradeço às agências: CAPES, FAPESP e UNDP/World Bank/Who Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os terminais dos cromossomos de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* contêm repetições teloméricas mantidas pela enzima telomerase da sequência 5'-TTAGGG-3', a qual é conservada também em outros tripanosomatídeos e outros eucariotos. Utilizando-se frações protéicas purificadas a partir de extratos S100 e nuclear, foi possível se detectar atividade de telomerase e três complexos proteína-DNA que se associam *in vitro* com sequências teloméricas ricas em G do parasita. A atividade de telomerase de *L. (L.) amazonensis* foi detectada por ensaio TRAP ("Telomeric Repeat Amplification Protocol") e apresenta características comuns às telomerases já descritas em outros tripanosomatídeos.

Os complexos proteína-DNA foram identificados por EMSA ("Electrophoretic Mobility Shift Assays") e ensaios de "UV cross-linking" e denominados LaGT1-3 (*Leishmania amazonensis* G-strand telomeric protein 1-3). Eles não são formados: i) com DNA telomérico na forma de dupla fita e com fita rica em C, ii) em experimentos de competição específica usando oligonucleotídeos de sequências de DNA telomérico, ou iii) após o tratamento enzimático com proteinase K. LaGT1 foi o complexo mais específico, o qual é formado com todas as sequências de DNA telomérico (Tel1-6, Tel30 e Tel36) e não se associa à sequência telomérica de *Tetrahymena*. As proteínas que formam os três complexos associam-se com uma sequência de RNA telomérico rica em G e um complexo similar a LaGT1 é formado com DNA telomérico na forma de dupla fita contendo uma projeção 3' simples fita terminal. A estimativa das constantes de dissociação (K_d) do complexo LaGT1 associado a sequência telomérica na forma de DNA e dos complexos LaGT2 e LaGT3 associados a sequências teloméricas na forma de DNA ou RNA, demonstra que estes se encontram na ordem de nM, característica comum a proteínas que ligam DNA na forma de simples fita. Os componentes protéicos dos complexos LaGT2 e LaGT3 foram purificados por cromatografia de afinidade e identificados após renaturação, como bandas de ~35 kDa e ~52 kDa, respectivamente. O componente protéico de ≤ 15 kDa de LaGT1 foi purificado em gel como um complexo irradiado com luz UV de ~18-20 kDa. Os componentes protéicos de LaGT2 e LaGT3 e o complexo irradiado LaGT1 foram digeridos em gel com tripsina e os peptídeos trípticos resultantes foram analisados por espectrometria de massa utilizando-se as técnicas: "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight" (MALDI-TOF) e "Liquid Chromatography Electrospray Ionization tandem Mass Spectrometry" (LC/ESI-

MS/MS), a análise dos espectros demonstrou que o componente protéico de ~35 kDa de LaGT2 é homólogo da proteína Rbp38 de *Leishmania* spp. enquanto, o componente protéico de ~52 kDa de LaGT3 é similar à subunidade 1 da proteína de replicação A (Rpa-1) de *Leishmania* spp. O componente protéico de ≤ 15 kDa de LaGT1 provavelmente uma proteína de *L. (L.) amazonensis* que ainda não foi identificada. A identificação das proteínas por espectrometria de massa, possibilitou a clonagem dos genes que codificam às mesmas. Neste trabalho apresentamos a caracterização parcial do gene que codifica o componente protéico do complexo LaGT3: subunidade 1 da proteína de replicação A de *L. (L.) amazonensis* (LaRpa-1). A análise da sua organização genômica demonstrou que o mesmo encontra-se provavelmente em baixo número de cópias ou em cópia única no genoma do parasita e que ele se localiza em uma banda cromossômica de ~0,8 Mb. Foi realizada também a análise conformacional parcial da interação entre a proteína nativa renaturada LaRpa-1 e o DNA telomérico rico em G de *L. (L.) amazonensis* (oligonucleotídeo Tel6) por espectroscopia de fluorescência mostrando-se um aumento da intensidade da fluorescência quando ocorre essa interação.

SUMMARY

The chromosomal ends of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* contain conserved 5'-TTAGGG-3' telomeric repeats, that are maintained by telomerase. Using Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) we detected telomerase activity in protein fractions purified from S100 and nuclear extracts. Protein complexes that associate *in vitro* with telomeric DNA sequences, LaGT1-3 (*Leishmania amazonensis* G-strand telomeric protein), were identified and characterized by electrophoretic mobility shift assays (EMSA) and UV cross-linking using protein fractions purified from S100 and nuclear extracts. The three complexes did not form i) with double strand DNA (dsDNA) and the C-rich telomeric strand, ii) in competition assays using specific telomeric DNA oligonucleotides, or iii) after pre-treatment with proteinase K. LaGT1 was the most specific, it is formed with all DNA telomeric sequences (Tel1-6, Tel30 and Tel36) and did not bind a *Tetrahymena* telomeric sequence. All three LaGTs associated with an RNA sequence cognate to the telomeric G-rich strand and a complex similar to LaGT1 is formed with a dsDNA bearing a 3' G-overhang tail. The dissociation constants (K_d) for LaGT1 complexed with telomeric DNA sequence, and for LaGT2-3 complexed with telomeric DNA and RNA sequences were in the nM range. The protein components of LaGT2 and LaGT3 were purified by affinity chromatography and identified, after renaturation, as ~35 kDa and ~52 kDa bands, respectively. The ≤ 15 kDa protein component of LaGT1 was gel-purified as a UV cross-linked complex of ~18-20 kDa. LaGT2 and LaGT3 protein bands and the irradiated LaGT1 complex were digested by trypsin and the resulting peptides were analysed by mass spectrometry techniques: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) and by Liquid Chromatography Electrospray Ionization tandem Mass Spectrometry (LC/ESI-MS/MS). The fingerprint analysis showed that the ~35 kDa protein component of LaGT2 was homologous to the *Leishmania* spp. Rbp38 protein, whereas the ~52 kDa component of LaGT3 was similar to the putative subunit 1 of replication protein A of *Leishmania* spp. and the ≤ 15 kDa protein component of LaGT1 was probably a novel *Leishmania* protein. The gene encoding the protein-forming complex LaGT3 (LaRpa-1) were cloning and partially characterized, the genomic organization analysis of *LaRPA-1* gene showed that it is present probably in low copy number or a single copy and was mapped on a chromosome of ~0,8 Mb. The partial conformational analysis of the interaction between native

LaRpa-1 and the telomeric G-rich DNA (Tel6) was performed using fluorescence spectroscopy, this analysis showed an increase of the fluorescence when the interaction occurs.

ABREVIATURAS

BSA:	albumina sérica bovina
CapLC:	cromatografia líquida capilar
cDNA:	DNA complementar
Cdc13:	"cell division cycle 13"
dATP:	desoxiadenosina-trifosfato
dGTP:	desoxiguanosina-trifosfato
DMSO:	dimetilsulfóxido
DNA:	ácido desoxirribonucleico
DNase:	desoxirribonuclease A
dNTP:	desoxinucleosídeo-trifosfato
DO:	densidade óptica
DTT:	1,4-ditiotreitol
EDTA:	ácido etileno diamino tetracético
EGTA:	ácido etileneglicol-bis-(β -aminoetil)-N,N,N',N' tetracético
EMSA:	"Electrophoretic Mobility Shift Assays"
Est (1-3):	"Ever shorter telomeres"
EtOH:	etanol
Hepes:	ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
IPTG:	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
KOAc:	acetato de potásio
LaGT	" <i>Leishmania amazonensis</i> G-strand telomeric protein"
LC/ESI-MS/MS	"Liquid Chromatography Electrospray Ionization tandem Mass Spectrometry"
MALDI-TOF	"Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight"
MeOH:	metanol
MeCN:	acetonitrila
mRNA:	RNA mensageiro
NaOAc:	acetato de sódio
NH ₄ OAc:	acetato de amônia
nt	nucleotídeo

NP-40:	nonidet P-40
pb:	par de bases
PBS:	solução salina tamponada com fosfato
PCR:	reação em cadeia da polimerase
PFGE:	eletroforese de campo pulsado ("Pulse Field Gel Electrophoresis")
PK:	proteinase K
Pot1:	"protection of telomeres 1"
p/v	peso/volume
p/p	peso/peso
Rap 1:	"Repressor activator protein 1"
Rbp 38	"RNA binding protein 38"
Rfa 2:	"Replication factor 2" (subunidade 2 da proteína Rpa)
RFLP	polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição de DNA ("Restriction Fragment Length Polymorphism")
Rif 1-2:	Rap-1 interacting factors 1-2
RNA:	ácido ribonucleico
RNase A:	ribonuclease A
rRNA	RNA ribossômico
Rpa 1:	Subunidade 1 da proteína de replicação A ("replication protein A -1")
SDS:	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE:	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SSC:	tampão citrato de sódio/cloreto de sódio
t.a.:	temperatura ambiente
TAE:	tampão Tris-acetato-EDTA
TBE:	tampão Tris-borato-EDTA
TE:	tampão Tris - EDTA
TEMED:	N, N; N', N'-tetrametilenodiamina
TTP:	timidina- trifosfato
TRAP	"Telomeric Repeat Amplification Protocol"
Tris:	tris- hidroximetilaminometano
Trf (1-2)	"telomere repeat factor 1-2"

tRNA	RNA transportador
Tebp	"telomere binding protein"
UV:	ultravioleta
v/v:	volume/volume
X-Gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-tiogalactopiranosídeo

Observações: Algumas das abreviaturas que foram utilizadas neste trabalho estão incluídas no texto da tese com os significados correspondentes.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	CARACTERÍSTICAS DOS PARASITAS DO GÊNERO <i>LEISHMANIA</i>	1
1.1.1	Ciclo de vida dos parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	3
1.1.2	Classificação taxonômica das espécies do gênero <i>Leishmania</i>	5
1.2	A LEISHMANIOSE	6
1.2.1	Leishmaniose tegumentar americana: aspectos gerais	6
1.2.2	Tratamento das leishmanioses tegumentares	8
1.2.3	Vacinas contra as leishmanioses	9
1.2.3.1	Importância das células T CD8 ⁺ como mediadoras de imunidade protetora contra <i>Leishmania</i>	10
1.2.3.1.1	Vacinas de subunidades que contêm epítopes reconhecidos por células T CD8 ⁺ protetoras	11
1.3	ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DOS PARASITAS DO GÊNERO <i>LEISHMANIA</i>	11
1.4	OS TELÔMEROS	13
1.4.1	Aspectos gerais	13
1.4.2	Estrutura dos telômeros de tripanosomatídeos	15
1.5	REPLICAÇÃO DO DNA E DOS TELÔMEROS: O PROBLEMA DA TERMINAÇÃO DA REPLICAÇÃO DO DNA	19
1.5.1	Finalização da replicação do DNA pela telomerase	20
1.5.2	Características gerais do componente TERT ("Telomerase Reverse Transcriptase")	21
1.5.3	Características gerais do componente TER ("Telomerase RNA")	22
1.5.4	Proteínas acessórias ao complexo enzimático telomerase	24
1.6	CROMATINA TELOMÉRICA: PAPEL NA REGULAÇÃO DO TAMANHO DOS TELÔMEROS E DA ATIVIDADE DA TELOMERASE	27
1.6.1	Composição da cromatina telomérica de eucariotos	27
1.6.2	Função do complexo telomérico	33

1.7	REGULAÇÃO DO TAMANHO DOS TELÔMEROS E DA ATIVIDADE DA TELOMERASE	34
2	JUSTIFICATIVA	39
3	OBJETIVOS	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	ORIGEM DOS REAGENTES E MATERIAIS	42
4.2	SOLUÇÕES E TAMPÕES	44
4.3	MEIOS DE CULTURA	45
4.3.1	<i>L. (L.) amazonensis</i>	45
4.3.2	<i>Escherichia coli</i>	46
4.4	OLIGONUCLEOTÍDEOS	46
4.4.1	Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de TRAP	46
4.4.2	Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para a amplificação do gene <i>LaRpa-1</i>	46
4.4.3	Oligonucleotídeos iniciadores do vetor M13 utilizados no seqüenciamento dos DNAs extraídos dos plasmídeos recombinantes	47
4.4.4	Oligonucleotídeos utilizados na caracterização adicional do complexo proteína-DNA telomérico LaGT1 de <i>L. (L.) amazonensis</i>	47
4.5	PARASITAS, BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	47
4.6	APARELHOS	47
4.7	ENSAIO PARA DETECTAR ATIVIDADE DE TELOMERASE ("TELOMERIC REPEAT AMPLIFICATION PROTOCOL": TRAP) EM EXTRATOS PROTÉICOS DE <i>L. (L.) amazonensis</i>	48
4.7.1	Ensaio "One tube TRAP"	48
4.7.2	Ensaio "Two Tube TRAP"	49
4.8	SEQÜENCIAMENTO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DAS PROTEÍNAS QUE FORMAM OS COMPLEXOS LaGT1-LaGT3 DE <i>L. (L.) amazonensis</i>	50
4.8.1	Preparação das amostras protéicas	50
4.8.2	Seqüenciamento dos peptídeos por LC/ESI-MS/MS	50
4.9	PURIFICAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS SINTÉTICOS	51

4.10	MARCAÇÃO RADIOATIVA DE FRAGMENTOS DE DNA E OLIGONUCLEOTÍDEOS PREVIAMENTE PURIFICADOS	51
4.10.1	Marcação do fragmento de DNA que contem a seqüência interna do gene <i>LaRpa-1</i> por "random primer extension"	51
4.10.2	Marcação do terminal 5' dos oligonucleotídeos por fosforilação radioativa	52
4.11	CARACTERIZAÇÃO ADICIONAL DOS COMPLEXOS PROTEÍNA-DNA TELOMÉRICO-: LaGT1-LaGT3 DE <i>L. (L.) amazonensis</i>	52
4.11.1	Análise da interação da proteína que forma o complexo LaGT1 com o DNA telomérico	52
4.11.2	Estimativa das constantes de dissociação (K_d) dos complexos LaGT1-LaGT3 com seqüências teloméricas de <i>L. (L.) amazonensis</i> ricas em G na forma de DNA e RNA	53
4.11.3	Renaturação das proteínas que formam parte dos complexos LaGT2 e LaGT3 de <i>L. (L.) amazonensis</i>	53
4.11.4	Análise conformacional da proteína LaRpa-1 ligada e não ligada à seqüência telomérica rica em G de <i>L. (L.) amazonensis</i> por espectroscopia de fluorescência	54
4.12	CLONAGEM DO GENE <i>LaRpa-1</i>	55
4.12.1	Extração de DNA genômico de <i>L. (L.) amazonensis</i>	55
4.12.2	Síntese de cDNA a partir de mRNA de formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	55
4.12.3	Clonagem do gene <i>LaRpa-1</i> utilizando-se amplificação por PCR	56
4.12.4	Purificação dos fragmentos de DNA amplificados por PCR	58
4.12.5	Preparação de bactérias competentes para serem usadas na clonagem do gene <i>LaRpa-1</i>	58
4.12.6	Clonagem em vetor de clonagem TOPO dos fragmentos de DNA amplificados por PCR contendo a seqüência total e parcial do gene <i>LaRpa-1</i>	59
4.12.7	Mini-preparações do DNA de plasmídeo recombinante	59
4.12.8	Obtenção da seqüência do gene <i>LaRpa-1</i>	60

4.13	CARACTERIZAÇÃO DO GENE <i>LaRpa-1</i>	60
4.13.1	Mapeamento do gene <i>LaRpa-1</i> em cromossomos de <i>L. (L.) amazonensis</i> separados por PFGE	60
4.13.1.1	Preparação das amostras de DNA cromossômico de <i>L. (L.) amazonensis</i>	60
4.13.1.2	Separação dos cromossomos de <i>L. (L.) amazonensis</i> por eletroforese de campo pulsado ("Pulsed Field Gel Electrophoresis": PFGE)	61
4.13.1.3	"Southern blotting" dos cromossomos ("chromo-blotting")	61
4.13.2	Análise da organização genômica do gene <i>LaRpa-1</i>	62
4.13.2.1	Digestão do DNA genômico de <i>L. (L.) amazonensis</i>	62
4.13.2.2	"Southern Blotting" do DNA genômico de <i>L. (L.) amazonensis</i>	62
5	RESULTADOS	64
5.1	MANUSCRITO PUBLICADO NO PERIÓDICO <i>European Journal of Biochemistry</i> : "Identification of three proteins that associate <i>in vitro</i> with the <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> G-rich telomeric strand"	64
5.2	RESULTADOS COMPLEMENTARES	79
5.2.1	Deteção de atividade de telomerase em extratos S100 e nuclear de <i>L. (L.) amazonensis</i>	79
5.2.2	Seqüenciamento por espectrometria de massa (LC/ESI-MS/MS) das proteínas que formam os complexos LaGT1-3	84
5.2.3	Caracterização adicional dos complexos proteína-DNA telomérico de <i>L. (L.) amazonensis</i> : LaGT1-LaGT3	91
5.2.3.1	Análise da interação do complexo LaGT1 com o DNA telomérico	91
5.2.3.2	Estimativa das constantes de dissociação (K_d) dos complexos LaGT1-LaGT3 com seqüências teloméricas ricas em G	93
5.2.3.3	Ensaio de renaturação das proteínas que fazem parte dos complexos LaGT2 e LaGT3 de <i>L. (L.) amazonensis</i>	96

5.2.3.4	Análise conformacional por espectroscopia de fluorescência da proteína renaturada LaRpa-1 na presença ou ausência do oligonucleotídeo de sequência telomérica simples fita Tel6	97
5.2.4	Clonagem e caracterização do gene <i>LaRpa-1</i>	99
5.2.4.1	Clonagem do gene <i>LaRpa-1</i> utilizando-se amplificação por PCR	99
5.2.4.2	Análise da sequência do gene <i>LaRpa-1</i>	101
5.2.4.3	Organização genômica e mapeamento cromossômico do gene <i>LaRpa-1</i>	103
6	DISCUSSÃO	105
6.1	Extratos de <i>L. (L.) amazonensis</i> possuem atividade de telomerase	105
6.2	Propriedades de interação dos complexos proteína-DNA de <i>L. (L.) amazonensis</i> : LaGTs	106
6.3	Clonagem e caracterização do gene <i>LaRpa-1</i>	110
6.4	Considerações sobre as metodologias usadas neste trabalho para a identificação das proteínas teloméricas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .	112
7	CONCLUSÕES	115
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

1. INTRODUÇÃO

1.1. CARACTERÍSTICAS DOS PARASITAS DO GÊNERO *LEISHMANIA*

Os parasitas do gênero *Leishmania* são protozoários unicelulares pertencentes à ordem Kinetoplastida, e à família Trypanosomatidae. A ordem Kinetoplastida se caracteriza pela presença de cinetoplasto localizado perpendicularmente ao eixo maior do organismo (Figura 1). O cinetoplasto é um compartimento especializado de uma mitocôndria, rico em DNA mitocondrial, ou DNA do cinetoplasto (kDNA) [1-3].

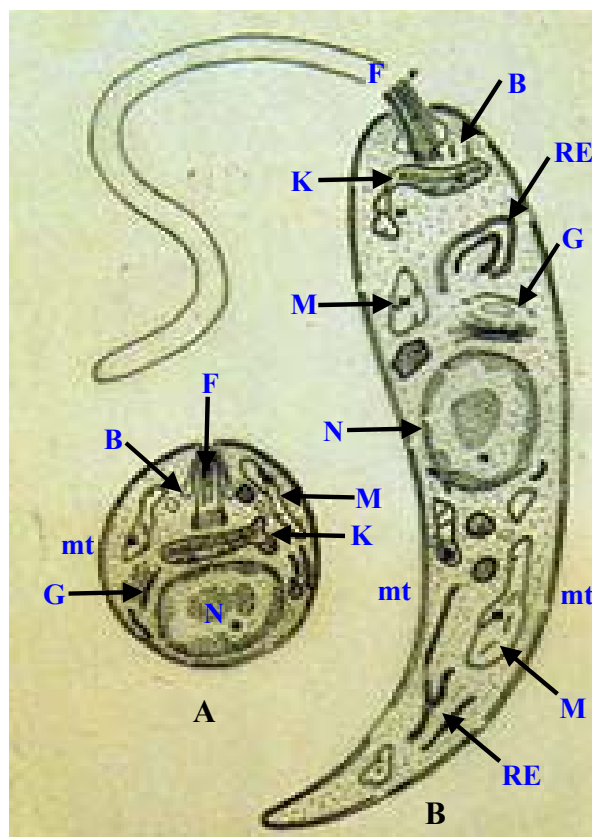


Figura 1. Desenho esquemático da ultra-estrutura das formas amastigota (A) e promastigota (B) de *Leishmania* spp. B, blefaroplasto; F, flagelo; G, complexo de Golgi; K, cinetoplasto; M, mitocôndria; mt, microtúbulos; N, núcleo; RE, retículo endoplasmático.

Ilustração retirada de: www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/morfologia.htm

O gênero *Leishmania* agrupa espécies de parasitas digenéticos, que durante seu ciclo de vida heteroxeno se apresentam sob duas formas fundamentais em diferentes hospedeiros: uma

flagelada, os **promastigotas**, que vivem no sistema digestivo do hospedeiro invertebrado bem como em meios de cultura axênicos; e outra sem flagelo, os **amastigotas**, que são parasitas intracelulares obrigatórios do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado [1, 2] (Figura 2). Os promastigotas são formas alongadas, medindo entre 10,0-40,0 μm x 1,5-3,0 μm , com flagelo em posição anterior. Os amastigotas são arredondados e medem entre 1,5-3,0 μm x 3,0-6,5 μm , não apresentam flagelo e durante o ciclo de vida se transformam em promastigotas. Estes últimos apresentam várias formas de transição no interior do intestino do hospedeiro invertebrado até diferenciar-se completamente em **promastigotas metacíclicos** que também são formas flageladas que possuem mobilidade intensa e são altamente infecciosos para o hospedeiro vertebrado [1]. As formas promastigotas podem ser facilmente obtidas em cultura axênica e, nesta condição, está bem estabelecido que as formas virulentas, mantidas sem passagem cíclica *in vivo* durante longos períodos, apresentam tendência a perder as propriedades infecciosas [4]. Algumas espécies de *Leishmania* também podem desenvolver no hospedeiro invertebrado formas **paramastigotas** que são pequenas e arredondadas ou ovais e com tamanho variando de 5,0-10,0 μm x 4,0-6,0 μm , e com flagelo curto que se exterioriza na região anterior do corpo [1].

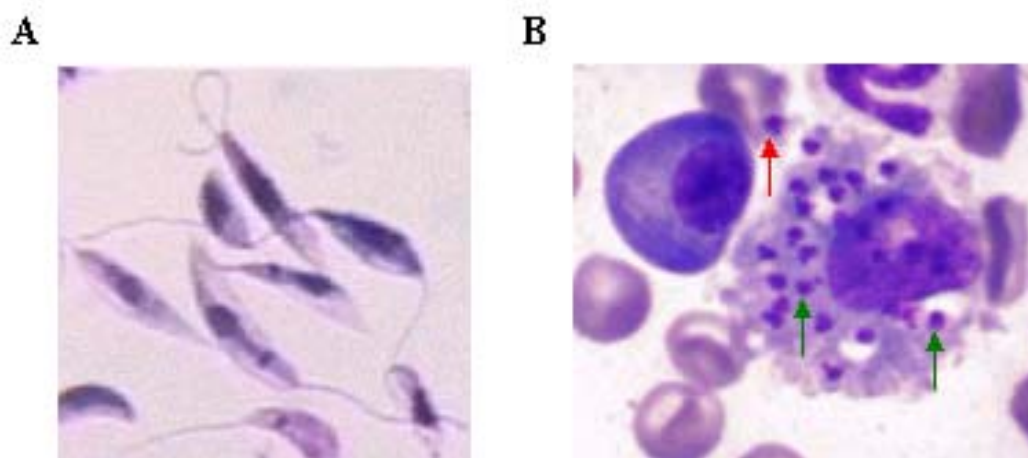


Figura 2. Formas evolutivas dos parasitas do gênero *Leishmania*. A) Formas **promastigotas** que são flageladas e alongadas e vivem no sistema digestivo do hospedeiro invertebrado e em meios de cultura axênicos. B) Macrófago infectado com **amastigotas**, formas sem flagelo e arredondadas que são parasitas intracelulares obrigatórios do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado. A seta vermelha indica a forma amastigota que está sendo liberada após a lise do macrófago. As setas verdes indicam amastigotas intactos no interior do macrófago.

Ilustração retirada de: www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/leishmaniasis

1.1.1. Ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania*

O ciclo de vida heteroxeno dos parasitas do gênero *Leishmania* inclui dois hospedeiros diferentes: invertebrado (intermediário) e vertebrado (definitivo) [2]. Como em outros Kinetoplastida, os parasitas desse gênero se multiplicam por fissão binária no sentido antero-posterior, dividindo primeiro o cinetoplasto e depois o núcleo [1].

Os **hospedeiros invertebrados** são pequenos insetos hematófagos da ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo [1, 2] (Figura 3).



Figura 3. Flebotomíneo (*Lutzomyia* spp.), hospedeiro invertebrado de *Leishmania* spp. no Novo Mundo. Ilustração retirada de: www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/

Os **hospedeiros vertebrados** incluem uma grande variedade de mamíferos silvestres que agem como reservatórios naturais do parasita, nos quais raramente *Leishmania* spp. produz doença. Os mais comuns são roedores, marsupiais, edentados, procionídeos, canídeos e primatas [1]. Estes reservatórios silvestres constituem a fonte principal de infecção de *Leishmania* spp. O homem e alguns animais domésticos (por exemplo, cães e equinos) são eventualmente infectados, convertendo-se em reservatórios domésticos do parasita, ao penetrarem nas florestas primitivas ou nas capoeiras (matas secundárias), onde habitam os reservatórios naturais silvestres e os hospedeiros invertebrados (insetos vetores) ou quando esses insetos invadem as casas próximas da mata. A transmissão ocorre através da picada do inseto (fêmea) hematófago infectado com parasitas [2].

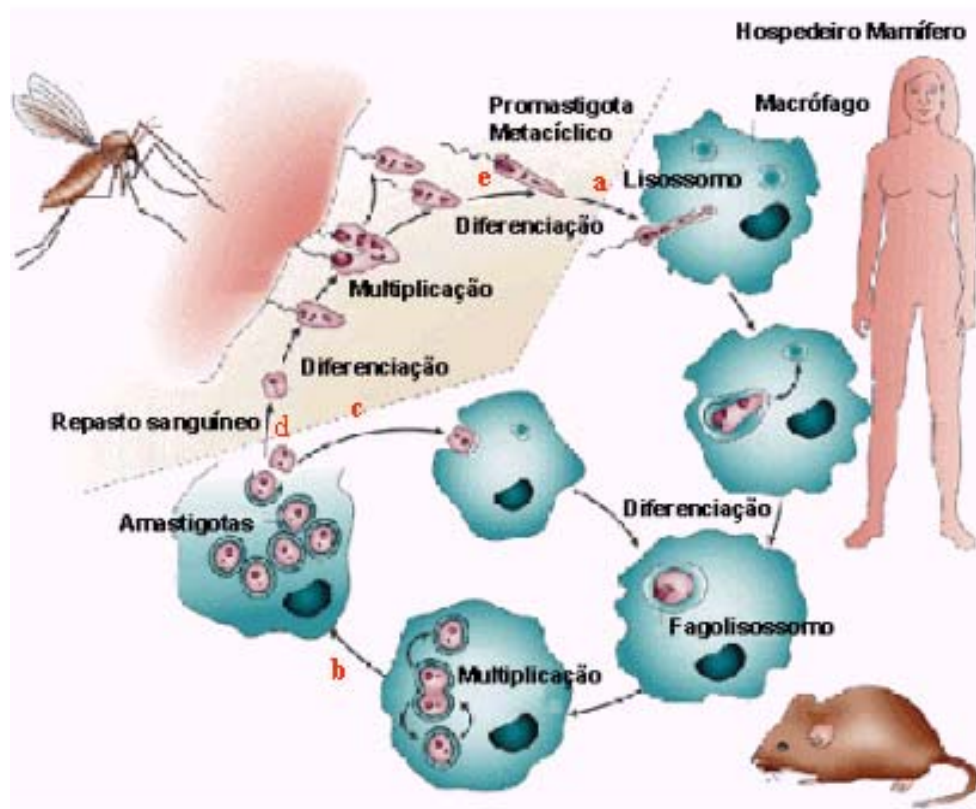


Figura 4. Ciclo de vida heteroxeno dos parasitas do gênero *Leishmania*: descrição detalhada do ciclo no texto (a-e). Ilustração retirada de: [5]

Durante o ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania* (Figura 4), o hospedeiro vertebrado é infectado quando os promastigotas metacíclicos são inoculados pelas fêmeas dos insetos vetores durante o repasto sangüíneo (a). Na pele do hospedeiro vertebrado, ao serem fagocitados pelos macrófagos, os promastigotas metacíclicos promovem a fusão dos lisossomos com o fagossomo e o parasita, para sua adaptação às condições do novo ambiente, sofre a transformação para a forma amastigota, intracelular obrigatória, capaz de desenvolver-se e multiplicar-se no meio ácido do vacúolo digestivo (b). Os amastigotas se reproduzem por divisão binária simples e após sucessivas multiplicações destroem a célula hospedeira provocando rompimento da membrana desta e liberação dos amastigotas que reiniciam um novo ciclo de infecção ao serem fagocitados por outros macrófagos (c). A infecção para o hospedeiro invertebrado ocorre quando a fêmea do inseto, pica o homem ou o animal infectado, retirando com o sangue e/ou a linfa intersticial contaminados, as formas amastigotas que passarão a evoluir no interior do tubo digestivo (d) onde o parasita sofre diferenciação morfológica. Na

porção anterior do aparelho bucal (proventrículo e faringe) do inseto são encontradas formas promastigotas metacíclicos livres ou aderidas (e). Por ocasião de um outro repasto sanguíneo essas formas são regurgitadas ou introduzidas na pele do próximo hospedeiro vertebrado (a). Completa-se desta forma o ciclo vital heteroxeno do parasita e sua propagação a novos indivíduos suscetíveis [1, 2, 5].

1.1.2. Classificação taxonômica das espécies do gênero *Leishmania*

Todas as espécies do gênero *Leishmania* pertencem ao Reino Protista, Subreino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophorea, Ordem Kinetoplastida, Subordem Trypanosomatina, Família Trypanosomatidae [1, 2].

Existe uma enorme dificuldade na classificação das espécies do gênero *Leishmania*, devido à grande semelhança morfológica entre elas. No entanto, estas espécies podem ser diferenciadas utilizando-se métodos bioquímicos e moleculares como, por exemplo, a mobilidade eletroforética de isoenzimas [6], a densidade de flutuação do DNA nuclear e do cinetoplasto [7] e a amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de seqüências de kDNA e de mini-exon [8-12]. Marfurt e col. [11, 12] utilizaram a técnica de PCR para a amplificação de seqüência de mini-exon com análise subsequente do polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição de DNA ("Restriction Fragment Length Polymorphism": RFLP).

Atualmente aceita-se como razoável, classificar as espécies que parasitam o homem em complexos fenotípicos, agrupados em dois subgêneros, cada um englobando várias espécies [1].

1) **Subgênero *Leishmania***: parasitas encontrados no Velho e Novo Mundo. Agrupa as espécies pertencentes aos seguintes complexos:

- ***Leishmania donovani***: *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) chagasi*.
- ***Leishmania mexicana***: *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (L.) enriettii* (exclusiva de animais), *L. (L.) aristidesi*.
- ***Leishmania hertigi*** (exclusiva de animais): *L. (L.) hertigi*, *L. (L.) deanei*.

O subgênero *Leishmania* também inclui outras espécies que ainda não foram agrupadas em complexos, entre elas estão: *L. (L.) tropica*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) major*, *L. (L.) pifanoi* e *L. (L.) garnhami*.

2) **Subgênero *Viannia***: parasitas encontrados na América tropical e subtropical. Inclui o complexo:

- ***Leishmania braziliensis***: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) colombiensis*.

1.2. A LEISHMANIOSE

Do ponto de vista clínico, o conceito que se tem é que as várias espécies de *Leishmania* que parasitam o homem induzem a uma doença espectral, com uma grande variedade de manifestações clínicas, que dependem da interação entre a resposta imune do hospedeiro vertebrado e a virulência, o tropismo e a patogenicidade deste parasita. Pesquisas epidemiológicas indicam, porém, que muitas infecções são assintomáticas ou subclínicas e que pacientes com sintomatologia acentuada representam apenas uma pequena proporção dos casos. Mesmo assim, a leishmaniose é considerada um importante problema de saúde pública pela sua magnitude, transcendência e pouca vulnerabilidade às medidas de controle [1, 2, 13].

Segundo a OMS (www.who.int/health_topics/leishmaniasis/) a leishmaniose apresenta-se sob quatro formas clínicas principais:

- 1) **Leishmaniose visceral (LV)**- por exemplo, Calazar causada por *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi*.
- 2) **Leishmaniose cutânea (LC)**- por exemplo, úlcera dos chicleros por *L. (L.) mexicana*, Leishmaniose cutânea por *L. (L.) amazonensis* nas Américas e Botão do Oriente por *L. (L.) major* na África e Ásia.
- 3) **Leishmaniose mucocutânea (LMC)**- causada por *L. (V.) braziliensis*.
- 4) **Leishmaniose cutânea difusa (LCD)**- por exemplo, causada por *L. (L.) amazonensis*.

1.2.1. Leishmaniose tegumentar americana: aspectos gerais

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) inclui as formas LC, LMC e LCD. No Brasil vem ocorrendo de forma endêmico-epidêmica, apresentando diferentes padrões de

transmissão, relacionados principalmente à penetração do homem em focos silvestres, freqüentemente em áreas de expansão de fronteiras agrícolas. Tem-se evidenciado a ocorrência da doença também em áreas de colonização antiga. Nestas, tem-se discutido a possível adaptação dos vetores e parasitas a ambientes modificados e a reservatórios. A LTA distribui-se amplamente no Continente Americano, estendendo-se do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina; é endêmica no México, na maior parte da América Central e em todos os países da América do Sul, exceto no Chile. No Brasil, tem sido assinalada em praticamente todos os estados, com maior incidência na região norte. Na década de 50, houve uma diminuição geral da ocorrência da LTA, porém o número de casos vem crescendo progressivamente nos últimos 20 anos. Os surtos são associados à derrubada de matas para construção de estradas e criação de povoados em regiões pioneiras. Desta forma, a LTA é, fundamentalmente, uma zoonose de animais silvestres, que pode atingir o homem ao entrar em contato com os focos zoonóticos. Neste caso, o maior número de acometidos são adultos jovens, do sexo masculino, que desempenham atividades de risco (garimpo, desmatamento, atividades extrativistas) nas regiões Norte e Centro-Oeste. Em áreas de colonização antiga, cães, eqüinos e roedores parecem ter papel importante como reservatórios naturais do parasita. A doença atinge pessoas de todos os sexos e idades [1].

Os agentes etiológicos mais importantes da LTA no Brasil são *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*. Além destas, existem outras espécies de *Leishmania* recentemente descritas: *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi* com poucos casos humanos relatados [1, 2].

A LTA causada por *L. (L.) amazonensis* é peculiar à bacia amazônica, sendo encontrada nas regiões nordeste, centro-oeste e sudeste do Brasil, mas tem sido relatada também nas Antilhas, Colômbia e Panamá. É uma zoonose de pequenos roedores silvestres e raramente a infecção atinge o homem, pois, o vetor é pouco antropófilo e de hábitos noturnos. Clinicamente a doença manifesta-se pela produção de lesões ulceradas únicas ou limitadas em número que poucas vezes se curam espontaneamente (Figura 5), não possui predileção por uma localização determinada, e não provoca metástases mucosas. Porém, em indivíduos com deficiência imunológica a *L. (L.) amazonensis* produz LCD ou forma disseminada anérgica da doença, caracterizada pela formação de lesões difusas, papulares ou nodulares, não ulceradas, contendo grande número de amastigotas. A doença envolve amplas áreas da pele, particularmente

extremidades e outras partes expostas. A LCD tem um curso crônico e progressivo durante toda a vida do paciente, não respondendo aos tratamentos convencionais [1, 13].

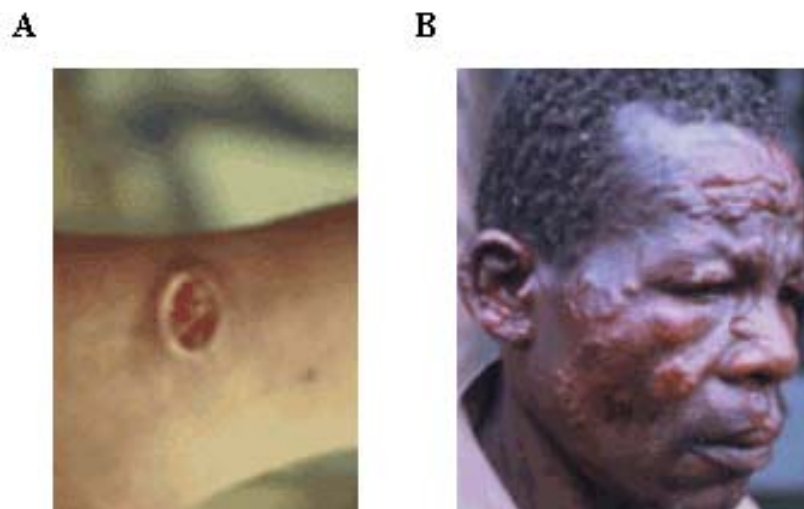


Figura 5. Apresentações clínicas da LTA causada por *L. (L.) amazonensis*. A) Leishmaniose cutânea: lesão ulcerada única de bordas elevadas em forma de cratera. B) Leishmaniose cutânea difusa: numerosas erupções papulares ou nodulares não ulceradas, que se espalham por amplas áreas da pele.

Ilustração retirada de: www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/

1.2.2. Tratamento das leishmanioses tegumentares

Os antimoniais pentavalentes (AP), como o estibogluconato de sódio (Pentostan) e o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime), foram introduzidos como quimioterápicos na década de 40 e continuam sendo as principais drogas utilizadas no tratamento desta doença. Esses compostos são indicados para o tratamento de todas as formas de leishmaniose tegumentar, embora as formas mucosa e mucocutânea exijam maior cuidado, por apresentarem respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas. O uso desses fármacos apresenta vários inconvenientes, por induzirem alta cardiotoxicidade e pela necessidade de tratamento muito prolongado e que nem sempre é efetivo. Quando não se obtém resposta ao tratamento com AP ou na impossibilidade de seu uso a segunda escolha recai sobre as Pentamidinas, que têm poder curativo inferior aos AP e toxicidade maior, exigindo amplo monitoramento do paciente. Outras drogas de menor eficácia também têm sido utilizadas como drogas alternativas no tratamento das leishmanioses, como a Anfotericina B e a Rifampicina [1, 2, 13].

Vários compostos vêm sendo estudados quanto a sua atividade leishmanicida, tais como: pirimetamina, cetoconazol, metotrexato, adriamicina e outros [14]. Um outro fármaco, miltefosine, foi testado na Colômbia, onde predominam as infecções por *L. (V.) panamensis*, os resultados desse estudo demonstraram que esse fármaco é bastante efetivo e de boa tolerância oral [15]. Entretanto, ainda não se tem um composto que apresente um bom índice terapêutico e uma baixa toxicidade.

1.2.3. Vacinas contra as leishmanioses

A sólida imunidade adquirida pelo hospedeiro após a recuperação da leishmaniose cutânea, incentivou o desenvolvimento de vacinas profiláticas. Essa imunidade é devida à indução e manutenção da resposta das células T envolvidas na produção de citocinas inflamatórias as quais ativam os macrófagos para eliminar os parasitas intracelulares (resposta do tipo Th-1, "T-helper cell-1") [16]. O estabelecimento de uma resposta imune protetora anti-*Leishmania* requer a apresentação de antígenos apropriados pelas células apresentadoras de antígenos, a indução e expansão de linfócitos Th-1 CD4⁺ e a ativação de macrófagos para uma eficiente eliminação dos parasitas. Então, é aceito que a vacinação efetiva contra infecção por *Leishmania* depende da geração de células T parasita-específicas de memória prolongada, que após a exposição aos parasitas, rapidamente se expandam como células Th-1 efectoras para a produção de IFN- λ , um mediador importante de resistência contra certos tipos de infecção por *Leishmania* spp. Deste modo, a maioria das pesquisas recentes no desenvolvimento de vacinas anti-*Leishmania* são direcionadas à identificação de moléculas de *Leishmania* capazes de desencadear esse fenótipo de produção de citocinas em modelos *in vivo* [17].

Vacinas preparadas a partir de organismos vivos infecciosos têm sido testadas. Esta técnica conhecida como leishmanização produz proteção significativa contra reinfecção, porém uma porcentagem de indivíduos inoculados podem desenvolver lesões. O perigo real da utilização de organismos vivos, levou à utilização de vacinas preparadas a partir de organismos mortos que é pouco efetiva. Por outro lado, o uso de organismos atenuados é uma outra abordagem que apresenta riscos pela possibilidade da reativação do parasita com a subsequente produção de lesões. Devido aos vários problemas e dificuldades associados com as vacinas tradicionais muitas pesquisas atuais utilizam as vacinas de DNA como estratégia na profilaxia de

Leishmania spp., este tipo de vacina envolve a administração de material genético, usualmente DNA plasmidial. As vantagens do uso dessas vacinas de DNA são: i) a possibilidade de produção de antígenos por tempo prolongado, similar à resposta a uma infecção natural, a qual pode levar à resposta celular de tipo Th1 e a uma melhor memória imunológica. ii) não é necessário utilizar adjuvantes. iii) o antígeno parasitário pode ser produzido na sua conformação nativa, aspecto muito importante na indução de proteção pelo hospedeiro. iv) produção fácil e de baixo custo. v) estabilidade do DNA [16].

1.2.3.1. Importância das células T CD8⁺ como mediadoras de imunidade protetora contra *Leishmania*

Está bem estabelecido que células T CD4⁺ restritas por moléculas MHC de classe II são extremamente dominantes durante o desenvolvimento de imunidade contra *Leishmania* spp. A importância dessas células foi ilustrada em estudos que usaram camundongos deficientes para a expressão de moléculas CD8 ou moléculas MHC de classe II. Depois de infecção subcutânea primária com *L. (L.) major*, camundongos deficientes de células CD8 controlaram a infecção durante mais de 1 ano [18]. Por outro lado, camundongos geneticamente deficientes de moléculas MHC de classe II foram altamente suscetíveis a infecção [19]. Estes resultados apoiam a noção que na ausência de células T CD8⁺, outros tipos de células (principalmente células T auxiliaadoras restritas por moléculas MHC de classe II) poderiam proporcionar um controle eficiente de uma infecção primária por *L. (L.) major* [20].

Apesar destas observações, estudos recentes que usaram baixas doses de promastigotes de *L. (L.) major* inoculados na derme demonstraram que camundongos deficientes de células T CD8⁺ não controlaram o crescimento do parasita. Também, estes animais tiveram uma patologia dérmica mais leve e tardia quando comparados com os animais de tipo selvagem. Neste modelo de infecção, a reconstituição da resistência foi obtida quando células T CD4⁺ e células T CD8⁺ foram transferidas adotivamente. Este estudo sugere que os linfócitos T CD8⁺ participam na patologia e na imunidade da infecção primária na pele com *L. (L.) major* [21]. Quando se re-estimulou *in vitro* com antígenos de *Leishmania*, células T CD8⁺ humanas segregaram IFN- λ , [22-24]. Também, em indivíduos que desenvolveram a forma mucocutânea da doença, linfócitos T CD8⁺ foram altamente citolíticos *in vitro* contra macrófagos infectados com *Leishmania* [25].

Junto com a evidência obtida com o modelo de infecção murina, parece que as células T CD8⁺ participam na patogênese e imunidade das leishmanioses cutâneo e mucocutânea [20].

1.2.3.1.1 Vacinas de subunidades que contêm epítopes reconhecidos por células T CD8⁺ protetoras

Baseados no fato de que as células T CD8⁺ constituem um importante mecanismo mediador de imunidade protetora contra *Leishmania* tem sido desenvolvidas vacinas de subunidades que contêm epítopes reconhecidos por células T CD8⁺ protetoras. Em *L. (L.) major*, a imunização com plasmídeo que contém o gene que codifica o antígeno LACK desencadeou imunidade protetora contra infecção em uma cepa de rato altamente suscetível (BALB/c). A imunidade protetora detectada foi principalmente mediada por células Th-1 CD4⁺ específicas, embora essa imunidade também foi em parte dependente dos linfócitos T CD8⁺ [26].

Uma avaliação adicional do papel das células T CD8⁺ demonstrou que elas podem funcionar como auxiliaadoras para o desenvolvimento de células T CD4⁺ efectoras. Nenhuma evidência indicou que a participação das células T CD8⁺ na imunidade protetora contra *L. (L.) major* esteja relacionada com a função efectora delas [27].

Até hoje a vacinação contra as leishmanioses não está disponível. As vacinas futuras podem complementar outras estratégias como quimioterapia e controle de vetores, para a prevenção e controle desta doença parasitária que representa um importante problema de saúde pública.

1.3. ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DOS PARASITAS DO GÊNERO *LEISHMANIA*

Os parasitas do gênero *Leishmania* são eucariotos, diplóides e sem ciclo sexuado de vida. Entre algumas das peculiaridades moleculares desses parasitas e dos Kinetoplastida em geral, podemos citar o "trans-splicing" do mRNA, a edição dos RNAs mitocondriais, a duplicação gênica e a transcrição policistônica dos seus genes. Nesses parasitas, o número de genes expressos é de aproximadamente 8-10 mil, organizados em grupos de ligação conservados entre as espécies [28, 29]. Os introns, característicos da organização genômica dos eucariotos superiores, não foram encontrados nos genes de *Leishmania* spp. [30].

Alonso e col. [31] compararam a composição de bases do DNA de diferentes tripanosomatídeos e encontraram que o genoma de *Leishmania* spp. é mais rico em G/C (57%) e em seqüências repetitivas [28, 29]. Estas seqüências são elementos comuns em organismos eucariotos e aparecem organizadas em repetições em *tandem* ou formando mini ou micro-satélites. Em *Leishmania* spp. 30% do genoma é formado por repetições as quais, usualmente, não são cromossomo-específicas e não são necessariamente compartilhadas por todos os cromossomos [32]. Os DNAs micro-satélites presentes nos cromossomos de muitas espécies deste parasita incluem repetições de 2-4 nt, sendo a repetição mais comum (CA)_n [33].

Leishmania spp. também pode apresentar material genético adicional em mini-cromossomos multicópias ou DNA circular, que podem aparecer espontaneamente ou como consequência de exposição a condições adversas tais como seleção a drogas [34, 35]. Tripp e col. [36] encontraram em diferentes espécies de *Leishmania* um elemento de DNA, com tamanho de 27,5 Kb, denominado LD1 ("*Leishmania* DNA 1") e que foi amplificado em aproximadamente 15% das cepas examinadas. Este elemento contém um *locus* multigênico localizado próximo a um dos telômeros (~100 Kb) do cromossomo 35. Várias porções de LD1 aparecem espontaneamente a partir de seqüências na região subtelomérica de um cromossomo e formam círculos extracromossomais ou mini-cromossomos lineares, os quais usualmente contém genes que codificam proteínas com funções importantes tais como ORFF ("Open Reading Frame" F, codifica uma proteína importante para a sobrevivência de *Leishmania* spp.) e ORFG ("Open Reading Frame" G, codifica um transportador putativo de biopterina de *Leishmania* spp.). Os elementos LD1 contêm um ou mais genes diferentes, os quais são freqüentemente duplicados e expressos após a translocação do LD1 para um novo *locus* cromossômico [36, 37]. Por exemplo: em *L. (L.) donovani* (cepa LSB-51.1), estes genes são superexpressos e duplicados por conversão gênica dentro do *locus* gênico de rRNA no cromossomo 27 [38]. Esta é uma evidência de que a expressão de determinados genes em *Leishmania* spp., como em outros Kinetoplastida pode ser controlada por reconfigurações genômicas dinâmicas que removem ou inserem seqüências em regiões subteloméricas, onde o ambiente pode ser explorado para o silenciamento ou ativação da transcrição dos mesmos [39].

Devido ao fato dos cromossomos destes parasitas serem muito pequenos a condensação dos mesmos durante a divisão celular não pode ser visualizada por microscopia de luz, dificultando a utilização de métodos citogenéticos convencionais. Desta forma, a separação dos cromossomos

destes organismos é realizada por eletroforese de campo pulsado ("Pulse Field Gel Electrophoresis": PFGE). Wincker e col. [40] conseguiram pela primeira vez resolver o cariótipo completo de muitas espécies de *Leishmania* usando sondas específicas de DNA, demonstrando que o genoma nuclear haplóide destes parasitas está organizado em aproximadamente 34-36 cromossomos individuais com tamanhos de 0,35 a 3,0 Mb cada, sendo que o tamanho total do genoma é de 35,5 Mb ($3,55 \times 10^7$ nt). Os cromossomos apresentam polimorfismo de número e tamanho entre as diferentes espécies e entre clones de uma mesma espécie. Parece que a variação entre os cromossomos homólogos é resultado de ampliações/deleções em regiões subteloméricas. Por exemplo, em *L. (L.) major*, a diferença de aproximadamente 20 Kb entre os dois homólogos do cromossomo 1 é devida a polimorfismos na região subtelomérica [38].

1.4. OS TELÔMEROS

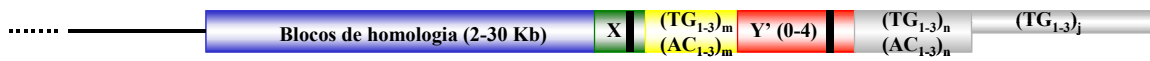
1.4.1. Aspectos gerais

Os telômeros são estruturas nucleoprotéicas especializadas localizadas nas extremidades dos cromossomos de organismos eucariotos. São constituídos por seqüências de DNA repetitivo, não codificador, associado a proteínas. Estas por sua vez, funcionam na manutenção e na estabilidade dos telômeros protegendo ("capping") os terminais dos cromossomos de degradação, fusões e eventos de recombinação. A integridade e funcionalidade dos telômeros são vitais para a viabilidade e o crescimento celular [41-44]. Além disso, os telômeros também têm papéis adicionais menos definidos na célula, como por exemplo, a formação do "bouquet" durante a meiose e a transcrição de genes em posição telomérica [45].

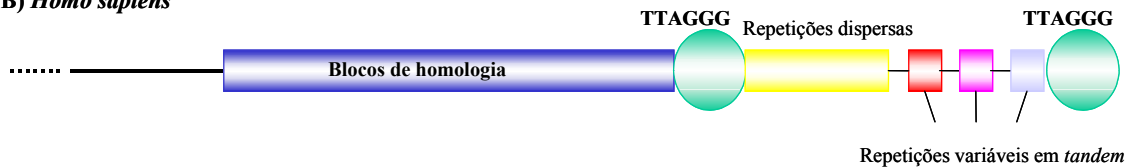
Na maioria dos eucariotos, o DNA telomérico é composto de pequenas seqüências (5-26 pb) repetidas em *tandem*, que são bastante conservadas entre os diferentes organismos e constituem sítios de ligação de proteínas específicas [46]. Tipicamente uma das fitas teloméricas é rica em resíduos G e está orientada no sentido 5' → 3' a partir de uma das extremidades cromossômicas e a outra fita é rica em resíduos C e está no antiparalelo. A maior parte do DNA telomérico está na forma de dupla fita, mas a fita rica em G forma uma projeção simples fita que avança em direção à extremidade 3', denominada de projeção 3' rica em G ("3' G-overhang") [47, 48]. Em mamíferos, essa projeção 3' simples fita rica em G invade a porção dupla fita e forma

uma estrutura "D-loop", denominada "T-loop" ("loop" do telômero) a qual é mantida exclusivamente por duas proteínas teloméricas Trf1 e Trf2 (Figura 6) [49]. Muñoz-Jordan e col. [50] descreveram estruturas semelhantes nos terminais de cromossomos de *Trypanosoma brucei*.

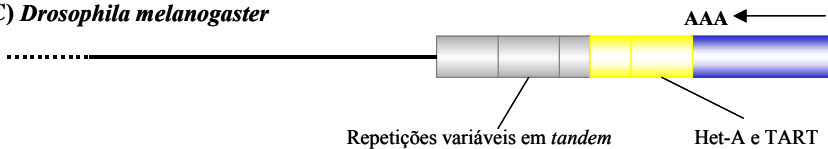
A) *Saccharomyces cerevisiae*



B) *Homo sapiens*



C) *Drosophila melanogaster*



D) Plantas



Figura 6. Representação esquemática dos telômeros de diferentes organismos eucariotos. A estrutura dos telômeros de muitos organismos eucariotos consiste além da repetição telomérica específica, em uma variedade de repetições dispersas localizadas mais internamente e repetições variáveis em *tandem* (satélites e mini-satélites). **A)** Os telômeros de *Saccharomyces cerevisiae* têm tamanho aproximado de 300 ± 75 pb e são constituídos por repetições 5'-TG₁₋₃-3', além de outros elementos repetitivos associados aos telômeros, os elementos subteloméricos X e Y'. Este último é o mais conservado e têm duas variantes: de 5,2 Kb e de 6,7 Kb. Repetições teloméricas internas e o elemento X dividem a região subtelomérica em dois domínios [42, 48] **B)** Em humanos os telômeros são compostos de seqüências conservadas do tipo 5'-T₂AG₃-3'. Além disso nesses terminais se encontram mini-satélites e repetições dispersas e uma estrutura de dois domínios muito similar à estrutura de *S. cerevisiae*, com grandes blocos de homologia compartilhados entre os diferentes cromossomos no domínio proximal. Também aparecem blocos curtos de homologia no domínio distal. **C)** Os telômeros de *Drosophila melanogaster* são compostos por DNA satélite e elementos transponíveis, como Het-A e TART, que são retrotransposons com seqüências ricas em G/T e caudas poli(A). **D)** As plantas usualmente apresentam DNA satélite nos telômeros ou em região subtelomérica, sendo que um espaçador pode ser encontrado entre o satélite e a repetição telomérica 5'-T₃AG₃-3' [42].

1.4.2. Estrutura dos telômeros de parasitas

O genoma nuclear de *Plasmodium falciparum* é extremamente rico em AT (~80%) e está organizado em 14 cromossomos lineares. O DNA telomérico de *Plasmodium* spp. consiste em repetições em *tandem* degeneradas e ricas em G, sendo a sequência mais frequente GGGTT(T/C)A [51-53]. O comprimento das repetições teloméricas mostra variação significativa entre as diferentes espécies (exemplo, 1.2 kb para *P. falciparum* e 6.7 kb para *P. vivax*), mas é relativamente conservado entre as cepas de *P. falciparum* [54]. A porção terminal do DNA telomérico de *P. falciparum* é empacotado em uma estrutura de cromatina não nucleosomal chamada telosoma, [55], como foi descrito nos telômeros de *S. cerevisiae*, humanos e *T. cruzi* [56-58]. A organização das TAS (“Telomere Associate Sequence”) é altamente específica para cada espécie. Em *P. falciparum* as TASs consistem em uma região codificadora e uma não codificadora. As regiões não codificadoras localizam-se adjacentes às repetições teloméricas e estão compostas de um mosaico de seis elementos repetitivos polimorfos chamados elementos repetitivos associados aos telômeros, que sempre são encontrados nos terminais dos cromossomos na mesma ordem e medem entre 20-40 kb [55]. TARA-6 que também é conhecido como rep20 é responsável em grande parte pelo polimorfismo de tamanho dos terminais dos cromossomos. As TAS não codificadoras são tão ricas em bases AT quanto as regiões codificadoras (70% AT). A especificidade de espécie do compartimento subtelomérico não é limitado à região não codificadora das TAS. Análises sistemáticas de sequências de vários cromossomos de *P. falciparum* revelou que as famílias de genes que codificam para fatores de virulência espécie-específicos envolvidas na variação antigénica e citoadesão encontram-se adjacentes à região não codificadora [59, 60].

Além de *Leishmania* spp., os tripanosomatídeos incluem outros parasitas de importância médica e epidemiológica tais como: *T. brucei* e *T. cruzi*. Embora pouco se conheça sobre a função das sequências teloméricas nos cromossomos destes parasitas sua estrutura se assemelha bastante à de outros eucariotos [61].

Em *T. brucei* (Figura 7A) o tamanho dos telômeros é de aproximadamente 10 a 20 Kb. A projeção 3' rica em G tem de 21 a 250 nt de comprimento. Essa projeção é encontrada nos dois telômeros de um mesmo cromossomo e como ocorre em humanos e ciliados, pode formar "T-loops" [50]. A estrutura das regiões teloméricas e subteloméricas em *T. brucei* têm um alto grau

de polimorfismo e compartilham muitas similaridades com as de outros eucariotos [62]. Os telômeros estendem-se a partir da projeção 3' rica em G até uma posição interna no cromossomo como uma sequência telomérica hexamérica: 5'-TTAGGG-3' de tamanho variável, seguida de uma região subtelomérica que contem genes ativos ou silenciosos de glicoproteínas da superfície do parasita ("variant surface glycoprotein": VSG) cuja expressão é exclusivamente subtelomérica, essas glicoproteínas são utilizadas para evadir a resposta imune do hospedeiro mediante um mecanismo de variação antigênica [61].

A clonagem e caracterização dos telômeros de *T. cruzi* (Figura 7B) revela que os mesmos são muito similares aos de *T. brucei* com respeito a sua composição e organização [63, 64]. A projeção 3' rica em G tem de 9 a 50 nt de comprimento e a sequência telomérica consenso característica é 5'-GGGTTAGGG-3' [63], que é idêntica à sequência antisenso da região molde hipotética do RNA da telomerase de *T. brucei* [65]. Adjacente à projeção 3' rica em G encontra-se a repetição telomérica dupla fita e uma junção conservada de 189 pb [63, 64]. Os telômeros de diferentes cepas de *T. cruzi* são altamente polimórficos em tamanho [64], provavelmente devido a conversão gênica/duplicação entre as sequências subteloméricas [66]. Cópias inteiras ou truncadas dos membros da família multigênica da sialidase Gp85, um dos fatores de virulência do parasita, também é encontrado em posições subteloméricas em diferentes cromossomos de *T. cruzi* [63, 64].

Já a arquitetura telomérica em *Leishmania* spp. (Figura 7C) parece ser uma exceção entre os tripanosomatídeos. Os cromossomos das diferentes espécies de *Leishmania* não apresentam cópias de genes codificadores de antígenos de superfície em posições teloméricas. Os telômeros de *Leishmania* são compostos pela sequência 5'-TTAGGG-3' [67-69], que é conservada entre os tripanosomatídeos [63] e outros eucariotos [70]. Uma repetição telomérica não conservada também é encontrada em *L. (V.) braziliensis*: 5'-CCTAACCCGTGGA-3' [67]. A projeção 3' rica em G em *L. (L.) donovani* e *L. (L.) major* tem aproximadamente 9 nt e a sequência consenso é 5'-GGTTAGGGT-3' [68, 69]. A região subtelomérica em *Leishmania* spp. está caracterizada pela existência de sequências conservadas associadas aos telômeros ("*Leishmania* Conserved Telomere Associated Sequences": LCTAS), além de sequências cromossomo-específicas. As LCTAS têm um tamanho de aproximadamente 100 pb e contém dois blocos de sequências conservadas: CSB1 ("Conserved Sequence Block 1", 5'-GTACAGT-3') e CSB2 ("Conserved Sequence Block 2", 5'-GGAGAGGGTGT-3'), separadas por 1 a 51 pb. As LCTAS podem

apresentar diferenças na organização, dependendo do cromossomo ou da espécie, indicando que essas seqüências devem ter importância no processo de segregação dos cromossomos ou que podem conter sítios para ligação de proteínas teloméricas [67].

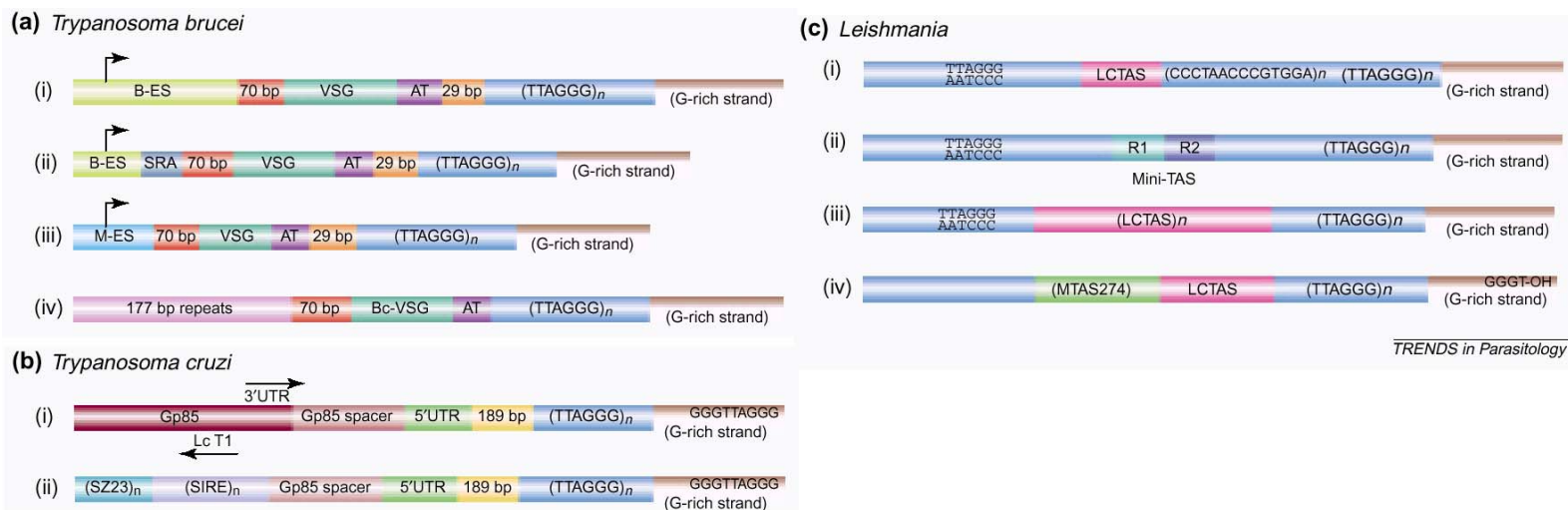


Figura 7. Representação esquemática dos telômeros de tripanosomatídeos. a) **Telômeros de *T. brucei*.** i) e ii) cromossomos de tamanho médio e grande que apresentam usualmente genes B-VSG ("Bloodstream VSG") teloméricos. Um promotor (seta preta) é encontrado entre 40–50 Kb localizado "upstream" dos genes VSG. Em muitos cromossomos aparecem repetições de 29 pb que separam os telômeros das seqüências AT subteloiméricas. Em ii), um gene B-ES ("Blood Form Expression Site") contém uma seqüência SRA ("Expressed Sequence Antigen", que confere resistência a soro humano) localizada "upstream" da repetição de 70 pb que é conservada e está presente em todos os telômeros. iii) representa um telômero que contém um gene M-VSG ("Metacyclic VSG"), o promotor está localizado "upstream" da repetição de 70 pb. iv) Mini-cromossomo com uma cópia de um gene Bc-VSG ("Basic copy-VSG"). A repetição de 70 pb é usualmente encontrada "upstream" do Bc-VSG seguida por um mini-satélite de 177 pb. b) **Telômeros de *T. cruzi*.** i) cromossomos contendo um gene que codifica um membro de uma família de sialidasas Gp85 na região subteloimérica. Alguns cromossomos contêm uma variação em uma das fitas em posição "upstream" ao gene Gp85. Em esse caso uma fita transcreve o 3'UTR da Gp85 em direção ao telômero e a outra fita transcreve uma seqüência parcial de um retrotransposon LcT1 em direção ao centrômero. ii) cromossomo contendo cópias subteloiméricas de elementos altamente repetitivos (SZ23 e SIRE) localizados "upstream" ao gene Gp85. c) **Telômeros de *Leishmania* spp.** i) telômeros/subtelômeros de *L. (V.) braziliensis*: Os telômeros de *L. (V.) braziliensis* além das repetições conservadas 5'-TTAGGG-3', apresentam uma repetição específica de 14 pb 5'-CCCTAACCCGTGGA-3', seguida por uma cópia de LCTAS, algumas repetições 5'-TTAGGG-3' e as seqüências cromossomo-específicas. ii) mini-cromossomos of *L. (V.) braziliensis*, os quais apresentam um elemento dimérico de 1,6 kb (R1 e R2), ou mini-TAS, flanqueada nos dois lados por repetições 5'-TTAGGG-3'. iii) *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani*, têm mais do que uma cópia de LCTAS flanqueadas nos dois lados por repetições teloméricas. iv) região subteloimérica do cromossomo 1 de *L. (L.) major*, que consiste em repetições em *tandem* de 274 pb (MTAS274). Uma cópia de LCTAS encontra-se nas proximidades dos telômeros dos dois homólogos do cromossomo 1. Os telômeros de *L. (L.) donovani* também apresentam uma repetição octamérica, uma seqüência simples de 62 pb e uma seqüência na projeção simples fita rica em G não conservada 5'-GGTTAGGGT-3', além da repetição 5'-TTAGGG-3'.

Ilustração retirada de: [61].

1.5. REPLICAÇÃO DO DNA E DOS TELÔMEROS: O PROBLEMA DA TERMINAÇÃO DA REPLICAÇÃO DO DNA

A replicação convencional do DNA em organismos eucariotos é efetuada pela enzima DNA polimerase. Esta enzima sintetiza uma das fitas do DNA de forma contínua, enquanto a outra fita é sintetizada de forma descontínua requerendo vários iniciadores de RNA como molde. A retirada do iniciador RNA mais distal na porção 5', ao término da replicação da fita descontínua, deixa um espaço de 8-12 nt não preenchido e gera uma projeção na forma de simples fita na porção 3' da outra fita ("3' G-overhang"). Este problema é referido como problema da terminação da replicação do DNA ("the end replication problem") [71, 72] e se deve ao fato de que a DNA polimerase sintetiza DNA sempre no sentido 5' → 3' (Figura 8). Assim, a cada ciclo de divisão celular os cromossomos estariam sujeitos ao encurtamento progressivo e perda de seqüências terminais, o que poderia comprometer a função de proteção necessária para manter a estabilidade genômica e a viabilidade celular. Por isso, a maioria das células eucariotas, incluindo as células que dão origem à linhagem germinativa, requerem uma polimerase específica denominada telomerase, para a manutenção dos telômeros [66]. Mecanismos alternativos para manutenção das extremidades cromossômicas são utilizados por alguns insetos como *Drosophila* spp. que alongam os telômeros usando um retrotransposon [73] e algumas células cancerígenas humanas e mutantes de leveduras defectivos para atividade de telomerase. Estes últimos utilizam um mecanismo alternativo de elongação telomérica denominado ALT ("Alternating Length of Telomere"), que compreende recombinação/conversão gênica entre as repetições em *tandem* [74, 75].

Neste trabalho será enfocada a manutenção dos telômeros pela enzima telomerase, como mostrado a seguir.

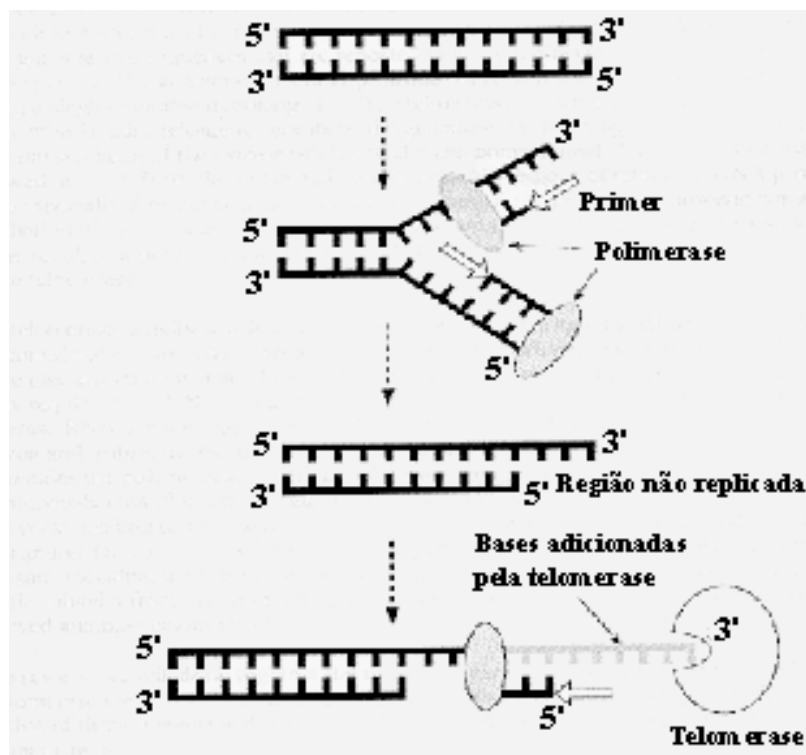


Figura 8. O problema da terminação da replicação do DNA. A DNA polimerase catalisa a replicação do DNA no sentido 5' → 3'. Durante esse processo uma das fitas de DNA é sintetizada de forma contínua, contrariamente à outra que requer vários iniciadores de RNA como moldes. Ao término da replicação da fita descontínua o iniciador de RNA mais distal na porção 5' é retirado, deixando um espaço não preenchido que gera uma projeção na forma de simples fita na porção 3' da outra fita. A telomerase soluciona este problema estendendo o terminal 3' do DNA simples fita usando como molde uma sequência contida em seu componente RNA intrínseco. **Ilustração retirada de:** [66]

1.5.1. Finalização da replicação do DNA pela telomerase

A atividade de telomerase foi descoberta em 1985 em extratos protéicos do protozoário ciliado *Tetrahymena thermophila* [76] e tem sido descrita em diversos outros eucariotos assim como em 90% das células cancerígenas e em células imortalizadas *in vitro*, com exceção das células humanas somáticas normais e de alguns insetos [65, 77, 78].

A holoenzima telomerase é uma ribonucleoproteína (RNP) que utiliza para a sua atividade uma subunidade de RNA intrínseca ("Telomerase RNA": TER) e uma subunidade catalítica protéica com características de uma transcriptase reversa ("Telomerase Reverse Transcriptase": TERT) [79].

Durante o ciclo de replicação do DNA, a telomerase atua adicionando novas repetições teloméricas à projeção simples fita rica em G do terminal cromossômico, mediante a utilização de uma parte de seu componente intrínseco, o RNA da telomerase ou TER. Este serve como molde para a elongação da fita G (Figura 9) [80, 81] e permite que durante novos ciclos de replicação do DNA, a síntese da fita rica em C seja efetuada pela maquinaria celular convencional (DNA polimerase α /primase) a partir dos telômeros [66, 72]. O complexo ativo da telomerase é um dos quatro componentes estruturais que contribuem na proteção dos telômeros, através da manutenção da funcionalidade dos mesmos [43].

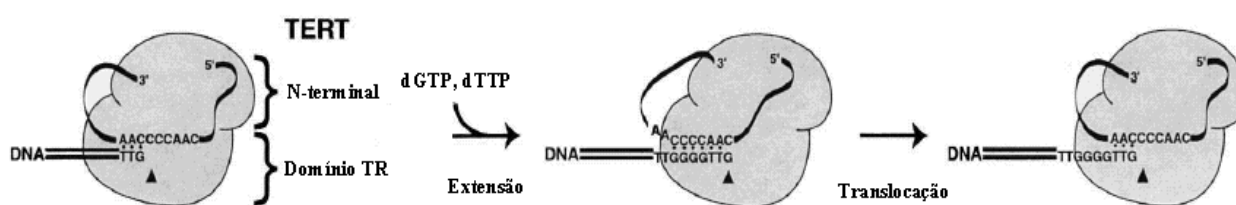


Figura 9. Ciclo de reação da telomerase: A subunidade TER é componente intrínseco do complexo enzimático pela interação com o domínio N-terminal da subunidade TERT. Isso deixa o molde no TER (seqüência contendo CA) livre para mover-se através do domínio de transcriptase reversa (TR). Assim o sítio ativo (▲) pode catalisar a adição de nucleotídeos ao terminal 3' OH do DNA telomérico até completar a extensão de uma repetição telomérica. Ao final da síntese de uma repetição ocorre translocação do molde ou do substrato e reinício de nova síntese. **Ilustração retirada de:** [81].

1.5.2. Características gerais do componente TERT ("Telomerase Reverse Transcriptase")

A subunidade protéica catalítica da telomerase foi purificada pela primeira vez a partir de células de *Euplotes aediculatus* [82]. O seqüenciamento dos peptídeos da proteína purificada (p123) revelou que a mesma continha motivos comuns às transcriptases reversas e similaridades com a proteína Est2 de *S. cerevisiae*. Esta última já havia sido identificada por seleção genética em mutantes que apresentavam telômeros de tamanho reduzido e fenótipo de senescência [83]. Baseados na seqüência conservada dentro dos motivos de transcriptase reversa da telomerase de *Euplotes*, vários grupos de pesquisa identificaram genes homólogos em humanos, camundongos, leveduras, protozoários, helmintos e plantas [84-91].

Embora os motivos de transcriptase reversa das TERTs de diferentes organismos sejam filogeneticamente relacionadas com outras transcriptases reversas [86], elas são mais

conservadas entre si, formando distintos subgrupos dentro da família de transcriptases reversas [92]. As características que distinguem as TERTs são: i) todos os motivos de transcriptase reversa estão localizados na região C-terminal, ii) a presença de um motivo T, específico das telomerasas localizado na região N-terminal, iii) a presença de domínios conservados funcionalmente importantes, na região N-terminal [86].

Bryan e col. [93] demonstraram que a maioria das telomerasas recombinantes de *Tetrahymena* se apresenta como um complexo monomérico de uma molécula TERT com uma molécula do RNA da telomerase. Do mesmo modo, a telomerase isolada do ciliado *E. aediculatus* pode aparecer tanto como um monômero quanto um dímero [94, 95], enquanto as telomerasas de leveduras e humanos apresentam-se multimerizadas [96, 97]. Estudos recentes com humanos indicam: i) que o complexo telomerase contém duas moléculas hTER funcionais, ii) que separadamente, fragmentos hTERT inativos podem multimerizar funcionalmente *in vivo* e *in vitro*, e iii) que moléculas hTERT multimerizam fisicamente *in vitro*, na ausência do componente RNA (hTR) [97-99].

1.5.3. Características gerais do componente TER ("Telomerase RNA")

O outro componente essencial para a atividade da telomerase, o RNA (TER: Telomerase RNA, também chamado TR em mamíferos ou *TLC1* em leveduras), contém uma sequência curta que atua como molde reverso da sequência telomérica a partir do qual as repetições de DNA telomérico são copiadas, provendo também funções necessárias para a ação enzimática da telomerase [46]. Esse molde é sempre maior que a repetição telomérica (1,2-1,9 cópias), permitindo o alinhamento da molécula de RNA com a projeção 3' rica em G e, conseqüentemente, a adição de dinucleotídeos trifosfatos durante a síntese de novas repetições teloméricas pela TERT [41, 66, 80] (Figura 9).

Embora existam diferenças na sequência primária dos diferentes TERs, estes apresentam estruturas secundárias conservadas entre organismos diferentes [100-102], incluindo um "pseudoknot", estrutura essencial para a atividade e montagem estável com a TERT [103]. Os TERs de vertebrados contém na região 3' um motivo que lembra o motivo H/ACA dos RNAs nucleolares pequenos ("small nucleolar RNA": snoRNA), que não é necessário para a atividade da telomerase *in vitro* [104, 105], mas atua na estabilidade e formação do terminal 3' da molécula

de RNA maduro *in vivo* [106]. Lukowiak e col. [107] demonstraram que o motivo H/ACA orienta a localização subcelular do RNA da telomerase e que tanto a retenção no núcleo quanto a localização nucleolar dependem deste motivo. Na Figura 10 apresenta-se um diagrama com a estrutura secundária do TER de vertebrados.

Em humanos e em leveduras o componente TER é transcrito pela RNA polimerase II, em contraste com ciliados, onde ele é transcrito pela RNA polimerase III. A forma madura de hTR tem um "cap" de 5' trimetilguanosina, o qual também é encontrado em outras RNP nucleares pequenas ("small nuclear ribonucleoprotein": snoRNP), envolvidas no processo de modificação ("splicing") de RNA [108]. hTER é expresso em menos de 1 a 5 cópias/célula em todos os tecidos que apresentam atividade de telomerase e nas células cancerígenas sua expressão é cinco vezes aumentada em relação às células normais [109, 110].

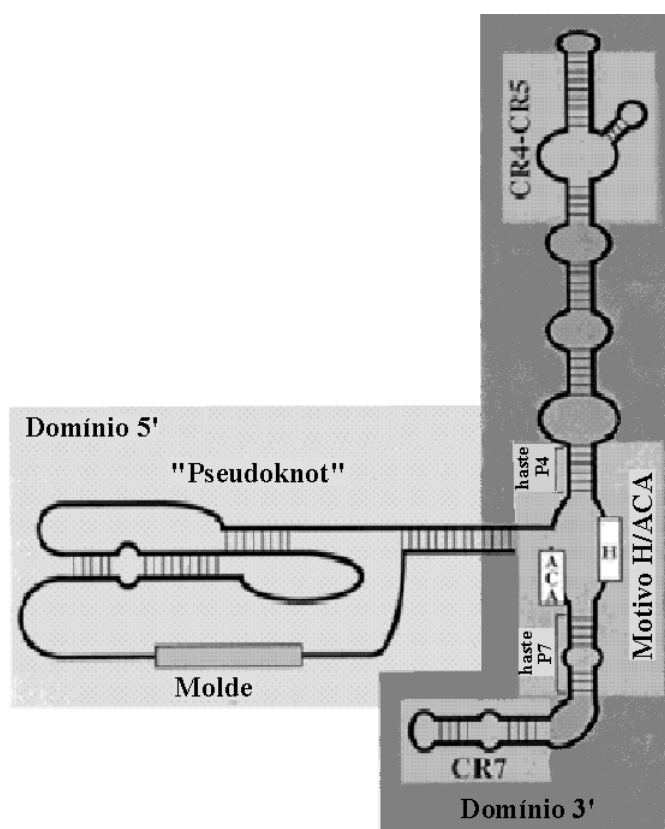


Figura 10. Modelo da estrutura secundária do RNA da telomerase de vertebrados. O domínio 5' contém a sequência molde e a região do "pseudoknot". O domínio 3' contém os domínios CR4-CR5, CR7 (conservados filogeneticamente) e o motivo H/ACA. Características estruturais adicionais do motivo H/ACA incluem as hastes P4 e P7 que flanqueiam as sequências dos motivos H e ACA.

Ilustração retirada de: [107].

1.5.4. Proteínas acessórias ao complexo enzimático telomerase

Além da TERT, um grande número de proteínas acessórias co-purificam com a atividade de telomerase. Embora essas proteínas não façam parte da subunidade catalítica da enzima, elas estão fisicamente associadas à telomerase, funcionando como reguladores positivos da atividade da mesma, afetando a processividade da enzima, sua interação com o telômero e a montagem do complexo enzimático [66, 79]. Em *T. thermophila* duas proteínas p80 e p95 foram identificadas por copurificação com a atividade de telomerase e o componente TER. Inicialmente, foi relatado que *in vitro* p80 se associa ao componente TER, enquanto p95, interage com oligonucleotídeos de sequência de DNA telomérico, sugerindo que essas proteínas eram componentes do complexo telomerase. Recentemente, foi demonstrado que p80 e p95 se associam entre elas formando um complexo, mas não interagem com o complexo TERT/TER sugerindo que elas não formam parte da telomerase ativa [111-113].

A purificação da telomerase do ciliado *E. aediculatus* revelou duas proteínas de 43 e 123 kDa, que aparentemente não estão relacionadas com as proteínas descritas em *Tetrahymena* [94]. Aigner e col. [114] demonstraram bioquimicamente que a proteína p43 é um componente do complexo ativo da telomerase em *E. aediculatus*, e tem similaridade com o auto-antígeno La, uma proteína que liga RNA e está envolvida na maturação dos transcritos pela RNA polimerase III.

Em mamíferos uma proteína associada à telomerase, Tep1 ("Telomerase protein 1"), foi descrita com base na similaridade de aminoácidos com a proteína p80 de *Tetrahymena*, a mesma foi descrita em humanos, camundongos e ratos [115, 116]. O tamanho dela é consideravelmente maior que p80 e também se associa ao componente TER [115]. Em humanos Tep1 (hTep1) co-imunoprecipita com a atividade de telomerase e com os homólogos de p123/Est2 (hTERT) [117]. Em leveduras, duas proteínas, Est1 e Est3 estão associadas a telomerase [118-120]. Embora, as mesmas não sejam necessárias para a atividade da TERT *in vitro* [120], mutações nos genes que as codificam levam ao encurtamento dos telômeros e perda da viabilidade celular *in vivo* [121]. Em *S. cerevisiae* as proteínas Sm, previamente implicadas na biogênese das snRNP, estabilizam as interações entre o componente TER e outras proteínas [122].

Foi demonstrado que duas proteínas chaperonas, p23 e hsp90, se associam com a telomerase humana e facilitam a montagem do complexo enzimático funcional [123].

É interessante notar que as proteínas NAP57/disquerina, hGAR1, hNOP10 e hNHP2, que se ligam ao motivo H/ACA das snoRNAs, também se associam ao componente TER da telomerase de humanos. A disquerina é uma proteína nucleolar envolvida na pseudo-uridilação de resíduos específicos de rRNA. Mutações no gene desta proteína levam a disqueratose congênita, uma síndrome de falha progressiva da medula óssea caracterizada por pigmentação anormal da pele, leucoplasia e distrofia das unhas [124]. Nos portadores dessa doença as células têm baixos níveis do componente TER, pouca atividade da telomerase e tem telômeros curtos [125]. A patologia dessa síndrome é consistente com uma diminuição na função da telomerase. Em relação a proteína hGAR1, anticorpos que a reconhecem especificamente a proteína hGAR1 podem imunoprecipitar com o motivo H/ACA das snoRNAs e com hTER em extratos de células HELA, demonstrando que hGAR1 é um componente desse motivo e das telomerases *in vivo* [126]. As proteínas hNOP10 e hNHP2 se associam especificamente com os RNAs que contém motivos H/ACA incluindo o componente hTER [127].

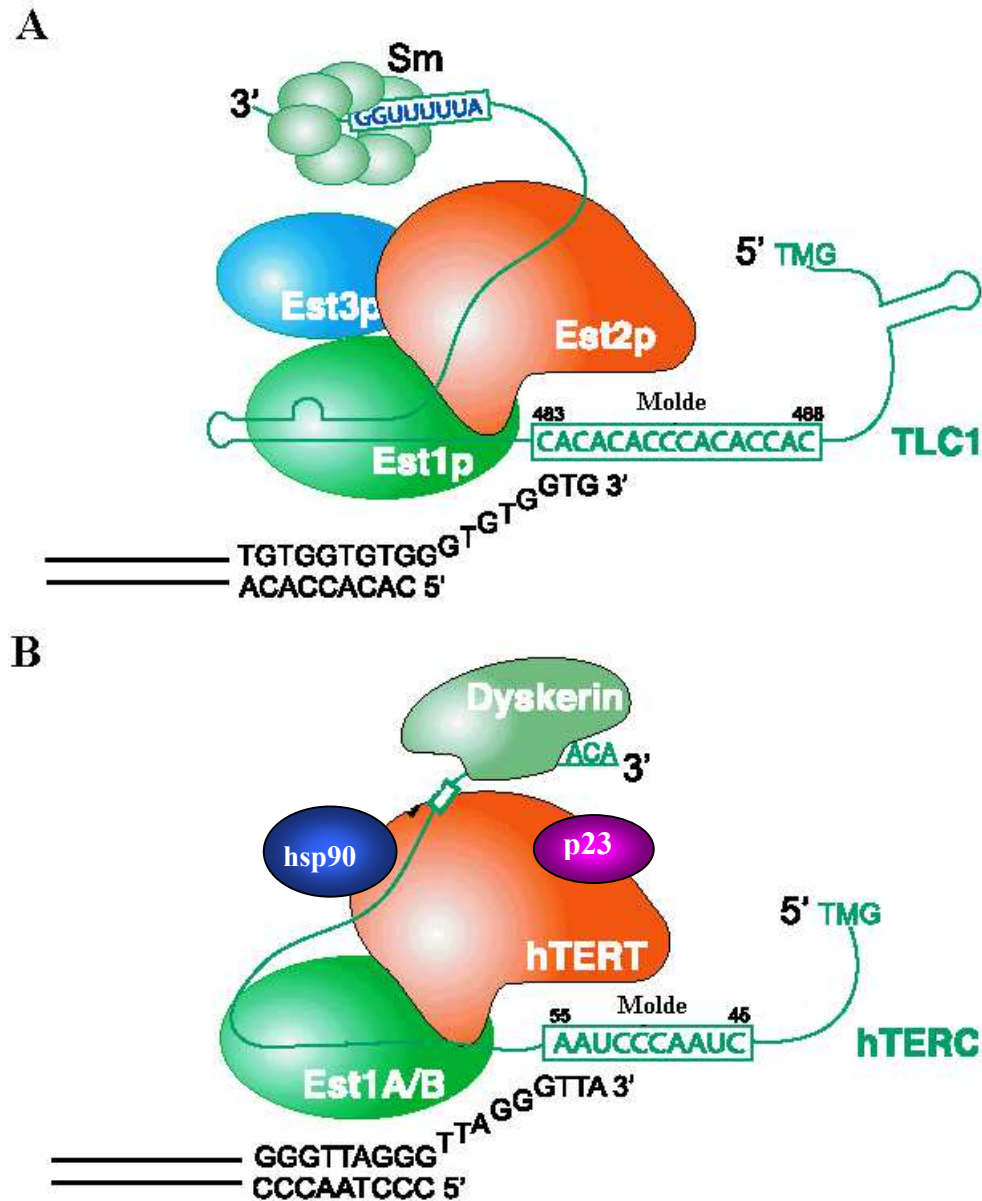


Figura 11. Estrutura da holoenzima telomerase. **A)** Em *S. cerevisiae* a holoenzima telomerase está formada pelos componentes TERT (Est2) e TER (TLC1) e dois fatores acessórios: Est1 e Est3. Proteínas Sm também estão associadas ao componente TER, provavelmente estabilizando as interações. **B)** Em humanos a holoenzima telomerase, além dos componentes TER (hTER) e TER (hTERC), apresenta dois fatores acessórios: Est1 A e Est1B e interage com a disquerina, uma proteína que se associa ao RNA; além dessas proteínas duas chaperonas hsp90 e p23 permitem a formação do complexo telomerase ativo. **Ilustração retirada de:** [122] com pequenas modificações.

1.6. CROMATINA TELOMÉRICA: PAPEL NA REGULAÇÃO DO TAMANHO DOS TELÔMEROS E DA ATIVIDADE DA TELOMERASE

1.6.1. Composição da cromatina telomérica de eucariotos

A cromatina telomérica de eucariotos está constituída por proteínas que se associam especificamente aos telômeros, as quais também estão envolvidas na manutenção da arquitetura nuclear, na ativação e repressão de genes adjacentes aos telômeros e na localização dos cromossomos dentro do núcleo [128]. Essas proteínas se classificam de acordo com a sua afinidade pelo DNA telomérico em proteínas que se associam à dupla fita e proteínas que se associam à simples fita rica em G [46]. Dentro do primeiro grupo estão Rap1 em *S. cerevisiae* [129, 130], Trf1 e Trf2 em mamíferos [131, 132] e Taz1 em *Schizosaccharomyces pombe* [133, 134] que geralmente atuam como reguladores negativos da telomerase [122]. No segundo grupo encontram-se Tebp α/β de *Oxytricha nova* [135], Pot1 em *S. pombe* e humanos [136], Cdc13 [137, 138] e Rpa-1 em leveduras [139] que ao contrário, funcionam na sua maioria como reguladores positivos da manutenção dos telômeros [122]. Componentes da maquinaria de reparo do DNA (por exemplo, o complexo Mre11) e da via de junção terminal não homóloga (por exemplo, Ku70/80) além de fatores de silenciamento de genes (por exemplo, complexo Rap1/Sir2), também são encontrados associados aos telômeros, atuando como reguladores positivos da manutenção dessas seqüências [43, 44, 140]. Essas proteínas todas, juntamente com a telomerase formam uma estrutura de ordem maior que protege os terminais dos cromossomos [43].

Existem evidências de conservação das proteínas teloméricas entre organismos eucariotos distantes. Embora as proteínas Pot tenham sido originalmente identificadas com base na similaridade de seqüência com a região N-terminal da subunidade α da proteína Tebp de *O. nova* [136], não existe similaridade aparente entre essas proteínas e Cdc13. Estas três proteínas pertencem a uma superfamília que contém motivos do tipo "OB fold" [141, 142] (Figura 12). O "OB fold" é um motivo estrutural pequeno utilizado para a ligação de oligonucleotídeos/oligossacarídeos e oligopeptídeos [143] formado por 5 fitas β que formam 2 pacotes ortogonais antiparalelos de folhas β [144]. Os primeiros "OB fold" citados na literatura foram: subunidade β da verotoxina 1 de *Escherichia coli*, nuclease de estafilococo e o domínio

de ligação do anticódon de aspartil-tRNA sintetase [143]. Subseqüentemente estes foram identificados em muitas outras proteínas, incluindo a subunidade 1 da proteína de replicação A ("Replication Protein A": Rpa-1) [145].

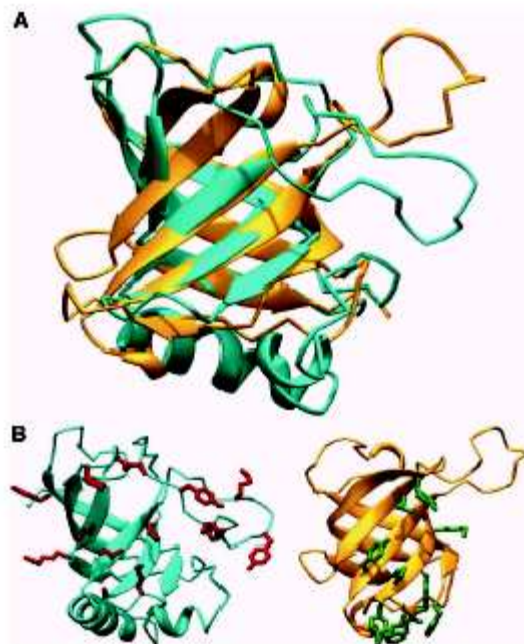


Figura 12. Comparação estrutural do motivo de ligação ao DNA ("DNA binding domain": DBD) da proteína Cdc13 com o motivo do tipo "OB fold" do domínio NH2-terminal da proteína α -Tebp de *O. nova*. (A) Imagem dos dois motivos do tipo "OB fold". O DBD de Cdc13 (resíduos 10-148) é mostrado em verde, e o motivo do tipo "OB fold" da proteína α -Tebp de *O. nova* (resíduos 37-150) é mostrado em amarelo. (B) Comparação das interfaces de ligação ao DNA dos dois motivos do tipo "OB fold". As cores são apresentadas como descrito em A, com resíduos de contato do DBD de Cdc13 (esquerda) em vermelho e os resíduos de contato do motivo do tipo "OB fold" do domínio NH2-terminal da proteína α -Tebp de *O. nova* (direita) em verde. Esta figura foi girada 40° a partir de A para ilustrar a diferença de tamanho entre as duas interfaces.

Ilustração retirada de: [146].

A proteína α -Tebp de *O. nova* relacionada com as proteínas Pot contém quatro motivos do tipo "OB fold", três dos quais participam integralmente na associação ao DNA. Em Cdc13 o motivo de ligação ao DNA ("DNA binding domain": DBD) exibe um alto grau de similaridade estrutural com os motivos "OB fold". Os alinhamentos das seqüências revelam que não existe similaridade apreciável entre o DBD de Cdc13 e os motivos do tipo "OB fold" de *O. nova*. Esta relação estrutural sugere que embora existam divergências na seqüência primária de aminoácidos, Cdc13 compartilha um ancestral comum com a proteína α -Tebp de *O. nova* e com as proteínas Pot. A similaridade estrutural entre o DBD de Cdc13 e outras proteínas envolvidas

na proteção dos telômeros demonstra que os motivos do tipo "OB fold" são elementos estruturais conservados para a ligação das proteínas ao terminal simples fita telomérico [146].

A Rpa, outra proteína que contém domínio "OB fold" e tem função telomérica em leveduras [139], foi originalmente purificada a partir de extratos de células como um componente essencial para a replicação *in vitro* do DNA do vírus de primatas (SV40). Ela se liga com alto grau de afinidade à simples fita de DNA e com muito menor afinidade a dupla fita de DNA e a de RNA. Esta proteína também está envolvida em processos importantes da célula como replicação, recombinação, regulação da transcrição através da associação a seqüências reguladoras específicas, "checkpoint" e reparo de DNA. Também pode estar envolvida na interação proteína-proteína e na fosforilação regulada pelo ciclo celular [147]. A Rpa constitui um complexo protéico estável que tanto em humanos, leveduras e kinetoplastida está formado por três subunidades (70, 32 e 14 kDa) [147-149]. Outras proteínas homólogas que ligam DNA na forma de simples fita têm sido identificadas em outros organismos eucariotos, indicando que a Rpa é um membro de uma família de proteínas que se associam ao DNA na forma de simples fita [147, 149].

O papel telomérico da Rpa está bem exemplificado em *S. cerevisiae*. Mutantes duplos *POL12/RPA-1* mostraram redução do tamanho dos telômeros e diminuição da viabilidade celular [150]. Além disso, a interação da proteína Cdc13 de leveduras com a subunidade catalítica da DNA polimerase α e Rpa interfere directamente no metabolismo telomérico [151]. Foi demonstrado recentemente por Schramke e col. [139], que em leveduras a Rpa está presente nos telômeros e que a perda da região N-terminal da Rfa-2 (subunidade 2 da Rpa) reduz consideravelmente o tamanho da seqüência telomérica, demonstrando que ela é necessária para a manutenção do tamanho dos telômeros. Estes autores também mostraram que a Rpa atua em uma via que envolve a telomerase (Est2) e Tel1 (regulador positivo da telomerase), regulando a ação enzimática durante a fase S do ciclo celular por facilitar a ligação da proteína Est1 ao telômero (Figura 13). Em humanos, a Rpa-1 também se associa com as helicases das síndromes de Werner e Bloom, e vai proteger longas regiões de DNA que foram desenroladas e que estavam previamente associadas à proteína telomérica Trf2 [152].

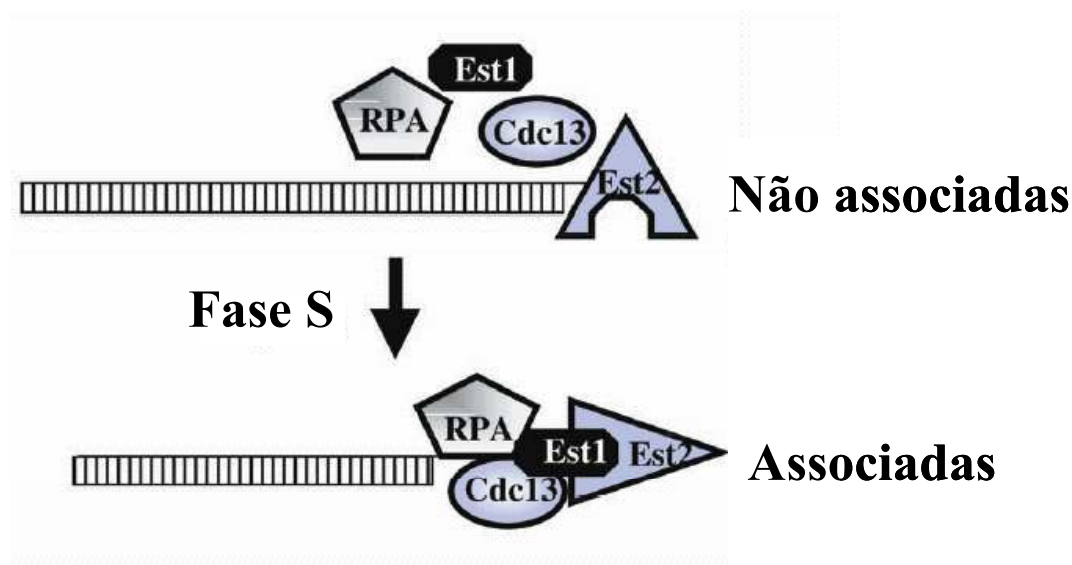


Figura 13. Modelo da ação da telomerase durante o ciclo celular. Na fase G1 do ciclo celular uma proporção da subunidade catalítica da telomerase (Est2) está associada ao telômero de forma inativa. Na fase S tardia a projeção terminal 3' rica em G está estendida e as proteínas Rpa, Est1 e Cdc13 encontram-se associadas ao telômero. A interação da proteína Est1 depende tanto de Cdc13 quanto de Rpa, enquanto a interação de Rpa e de Cdc13 com o telômero pode ocorrer independentemente. O complexo formado entre a projeção terminal 3' rica em G e as proteínas Rpa, Cdc13 e Est1 é essencial para a ação da telomerase nos terminais dos cromossomos. Porém, a interação entre essas proteínas Rpa, Est1, Est2 e Cdc13 parece ser transitória, indireta ou ambas. **Ilustração retirada de:** [139] com pequenas modificações.

A composição da cromatina telomérica dos tripanosomatídeos é pouco conhecida [61] (Figura 14C). Eid e Sollner-Webb [153, 154] descreveram dois complexos proteína-DNA (St1 e St2) que se associam à região subtelomérica e à porção dupla fita dos telômeros de *T. brucei*. Essas proteínas parecem formar um complexo único de ligação ao DNA e sua função biológica permanece desconhecida. Além dessas, foram identificados três complexos proteína-DNA (C1, C2 e C3) com afinidades pela fita telomérica rica em G de *T. brucei* [155]. O complexo C3 tem características funcionais semelhantes às proteínas Est1 e Est3 de levedura [118-120, 155].

Na tabela 1 apresenta-se um resumo das proteínas que se associam aos telômeros de eucariotos e na Figura 14 uma representação esquemática da composição da cromatina telomérica em diferentes organismos.

Neste trabalho mostramos, além da atividade de telomerase, que existem proteínas que formam complexos específicos *in vitro* com a fita rica em G dos telômeros de *L. (L.) amazonensis*. Duas dessas proteínas foram identificadas usando-se genética reversa, como sendo homólogos das proteínas Rbp38, encontrada somente em organismos Kinetoplastida [156] e

Rpa-1, que nesses organismos apresenta características específicas e peculiares como veremos adiante.

TABELA 1. Resumo das proteínas que se associam aos telômeros de eucariotos [61, 122, 157, 158]

Classificação	Leveduras	Ciliados	Tripanosomatídeos	Mamíferos
Proteínas que se associam à simples fita rica em G (projeção 3' rica em G)	TERT (Est2) Est1 Est3 Cdc13 (Stn1) Rpa-1 SpPot1 ^a	TERT p80/p95 p43 <i>OnTebp</i> α/β	TERT C1 C2 C3 Tbt1	TERT hPot1 Tp1 Est1a/b
Proteínas que se associam à dupla fita	Rap1 (Rif1 e Rif2) SpTaz1 ^b	-----	St1 St2	Trf1 (Tin2 e Tanquirase 1 e 2) Trf2
Proteínas da maquinaria de reparo em quebra de DNA em dupla fita	Ku 70/80 Rad50/Mre11/Xrs2	-----	Ku 70/80	Ku 70/80 Rad50/Mre11/Nbs1

^a SpPot1 = proteína Pot1 de *S. pombe*

^b SpTaz1 = proteína Taz1 de *S. pombe*

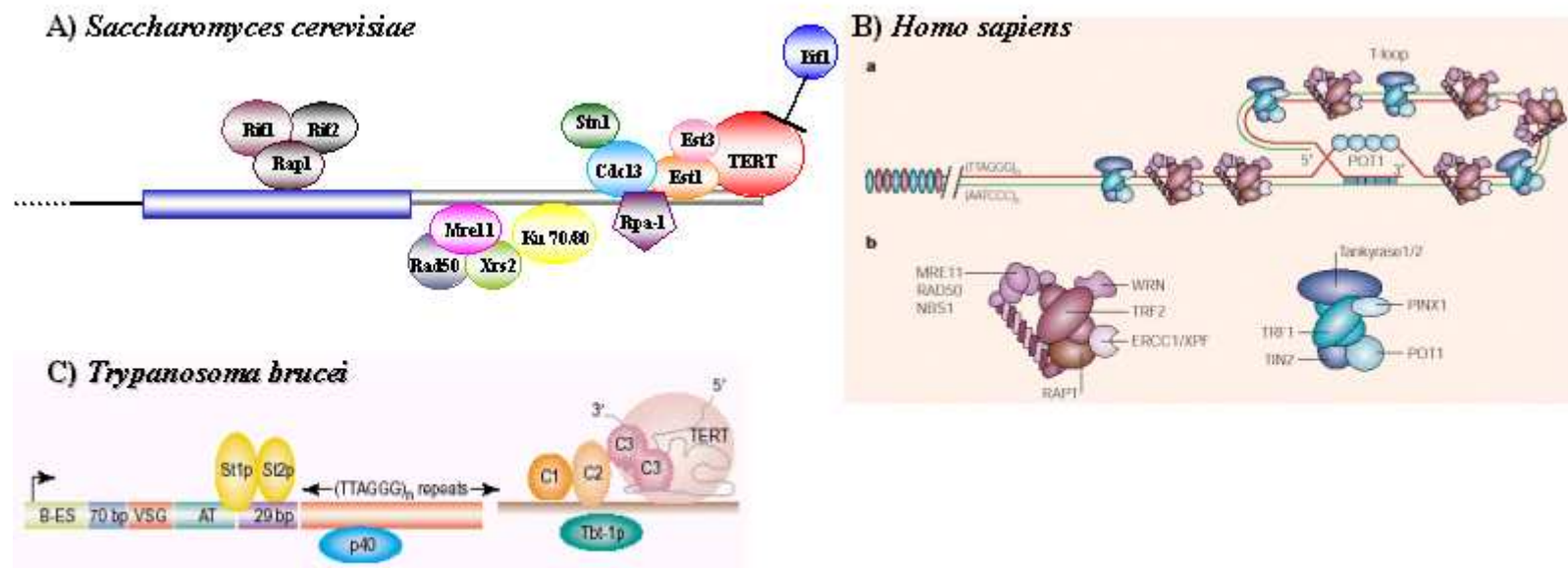


Figura 14. Representação esquemática da composição da cromatina telomérica em diferentes organismos. A) A cromatina telomérica de *S. cerevisiae* está composta por proteínas que se associam à simples fita telomérica: TERT (Est2) e as duas proteínas associadas Est1 e Est3, Cdc13 e Rpa-1 e proteínas da maquinaria de reparo: complexo Mre11/Rad50/Xrs2 e Ku 70/80. Também por proteínas que se associam ao DNA telomérico na forma de dupla fita, esse é o caso do complexo Rap1/Rif1/Rif2. A proteína Pif1 se associa à TERT [159]. B) Modelo da estrutura do complexo telomérico humano. a) Os telômeros de humanos estão compostos por 2–30 Kb da repetição 5'-TTAGGG-3' e finalizam em uma projeção 3' simples fita de 100–200 nt da sequência mencionada. Esse DNA telomérico pode formar um "T-loop" no qual a projeção terminal 3' rica em G invade a repetição telomérica na forma de dupla fita formando uma estrutura chamada "D-loop". A proteína Pot1 se associa ao DNA telomérico na forma de simples fita. As proteínas Trf1 e Trf2 se associam ao DNA telomérico na forma de dupla fita. b) Trf1 e Trf2 recrutam outras proteínas tais como tanquirases e Rap1 para os telômeros. Além das proteínas mencionadas anteriormente outras proteínas, como por exemplo, Ku70/80 e as helicases das síndromes de Werner (WRN) e Bloom podem estar associadas aos telômeros de humanos; ERCC1/XPF é uma endonuclease de reparo de excisão de nucleotídeos e o complexo MRE11 da maquinaria de reparo de quebra de DNA em dupla fita formado pelas proteínas Mre11, Rad50 e Nbs1; as proteínas PinX1, Pin2 e Tin2 também se encontram na cromatina telomérica de humanos. **Ilustração retirada de:** [160]. C) Modelo da composição parcial da cromatina telomérica de *T. brucei*. Os componentes do complexo telomérico parcial do parasita, além da TERT, são: St1p/St2p, p40, C1, C2, C3 e a proteína telomérica Tbt-1p que ainda não foi caracterizada. **Ilustração retirada de:** [61].

1.6.2. Função do complexo telomérico

O complexo telomérico existe em duas formas: protegida e desprotegida [43] (Figura 15). A funcionalidade dos telômeros está determinada pela estabilidade da forma protegida, pois a forma não protegida não é funcional [161]. Existem pelo menos quatro componentes estruturais que contribuem na proteção dos telômeros [43, 161]: a) complexo telomérico proteína-DNA de ordem maior, cuja estrutura é dependente do tamanho do telômero, determinando o acesso da telomerase ou das nucleases ao DNA telomérico, b) complexo protéico que se associa às repetições teloméricas terminais, c) complexo proteína-DNA presente na projeção de DNA simples fita rica em G do telômero, o qual provavelmente está envolvido com a prevenção de respostas a danos no DNA e com a regulação da estrutura dos telômeros dependente do ciclo celular e d) a telomerase ativa. Todos estes componentes atuam sinergisticamente na proteção dos telômeros: o comprometimento de um deles pode ser inofensivo, se dois ou mais se encontram afetados os telômeros ficam sem proteção, acarretando sérias consequências moleculares e celulares como a degradação por exonucleases, fusões terminais e eventos de rearranjo [43, 44, 128].

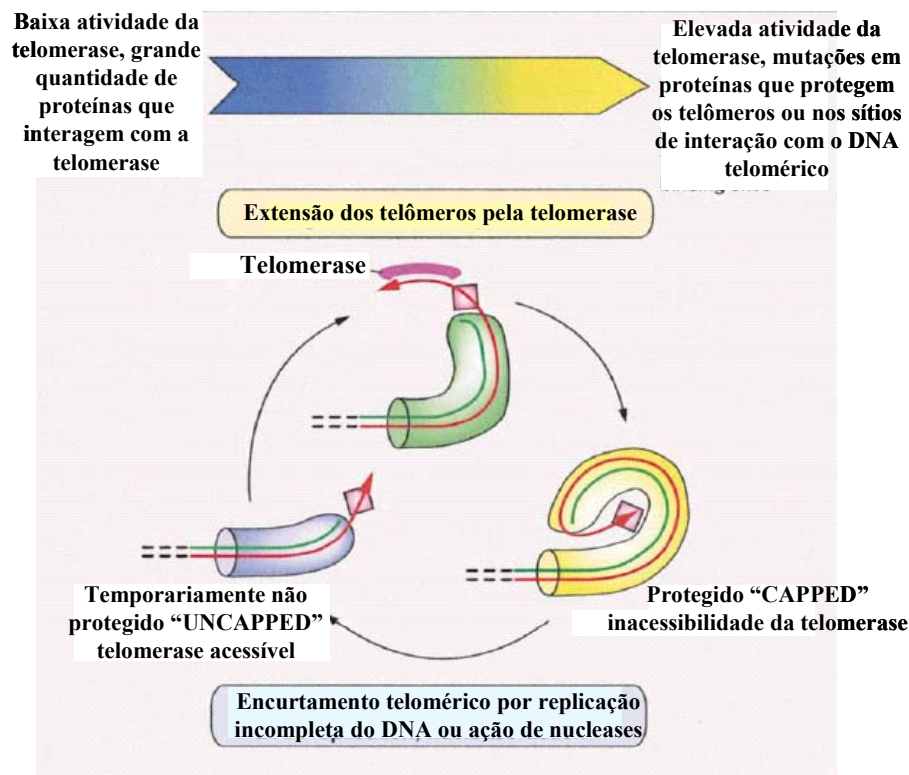


Figura 15. Durante a divisão celular os telômeros alternam entre os estados protegido (estado de inacessibilidade da telomerase) e temporariamente desprotegido (estado de acessibilidade da telomerase). Durante a vida celular, o complexo proteína-DNA telomérico pode se encontrar em estado não protegido (azul) e acessível para a ação da telomerase. Assim, o telômero estendido (verde) assume uma estrutura protegida não permitindo o acesso da enzima (amarelo). Essa proteção pode persistir durante muitas divisões celulares sem acontecer extensões dos telômeros pela telomerase ou até que o telômero fique encurtado o suficiente para acionar essa enzima (estado não protegido). Em situações normais, em uma célula com atividade de telomerase, essa ausência de proteção temporária dos telômeros desencadeia uma resposta que envolve o complexo ATM (Tel1) quinase, que atua no telômero tornando-o competente para a ação da telomerase (pelo menos em parte através da fosforilação do complexo Rad50/Mre11/Xrs2, NBS1). *Ilustração retirada de:* [44].

1.7. REGULAÇÃO DO TAMANHO DOS TELÔMEROS E DA ATIVIDADE DA TELOMERASE

Os terminais teloméricos são os sítios onde ocorrem a regulação da atividade da telomerase. Essa regulação pode ocorrer durante o recrutamento da enzima aos terminais dos telômeros, no início ou durante os ciclos de alongação. Quando as células utilizam métodos independentes da telomerase para a manutenção dos telômeros, o tamanho dos mesmos individualmente é muito variável de um cromossomo para o outro. Contrariamente, quando a

telomerase está disponível, pelo menos em leveduras selvagens ou em células tumorais humanas, os telômeros são estavelmente mantidos dentro de uma distribuição de tamanho relativamente estreita, existindo um balanço entre encurtamento dos telômeros e a sua elongação pela telomerase [162]. O tamanho dos telômeros é influenciado pelo nível da expressão da telomerase, mas depende também de vias de controle que atuam *in cis* em cada telômero individualmente (Figura 16). As primeiras observações do controle do tamanho dos telômeros *in cis* foram realizadas por Blackburn e col. [163, 164], os quais introduziram um plasmídeo linear exógeno em leveduras e encontraram que as células adicionavam novos telômeros com o mesmo tamanho dos telômeros endógenos. Similarmente, um novo telômero pode ser formado depois transfectando-se seqüências teloméricas em células de mamíferos. Nesse processo o novo telômero é estendido gradualmente até igualar o tamanho dos telômeros da célula hospedeira. Recentemente, Teixeira e col. [165] demonstraram que a elongação telomérica é um processo estocástico que não acontece em todos os telômeros em cada ciclo celular. Telômeros curtos têm maior probabilidade de serem estendidos que os telômeros compridos e um número variável de repetições teloméricas devem ser adicionados a cada ciclo de replicação. Mas o número de nucleotídeos adicionados não se correlaciona com o tamanho telomérico, a menos que os telômeros já estejam demasiadamente encurtados.

Em *S. cerevisiae* a manutenção dos telômeros é regulada primariamente pela proteína Cdc13 que se associa preferencialmente à fita rica em G [137]. Cdc13 interage com a proteína Est1 e essa interação resulta no recrutamento da telomerase ao terminal dos cromossomos, como demonstrado em experimentos de fusão de genes nos quais Cdc13 ou seu domínio de associação ao DNA interagiu com o componente protéico do complexo telomerase, por exemplo, Est2, Est1, e Est3. A proteína Est1 pode ter um outro papel, além de mediar a interação entre Cdc13 e a telomerase, em células que expressam a fusão Cdc13-Est2, a presença de Est1 resulta em telômeros muito mais compridos, sugerindo que ela exerça papel de regulador positivo do tamanho telomérico [166].

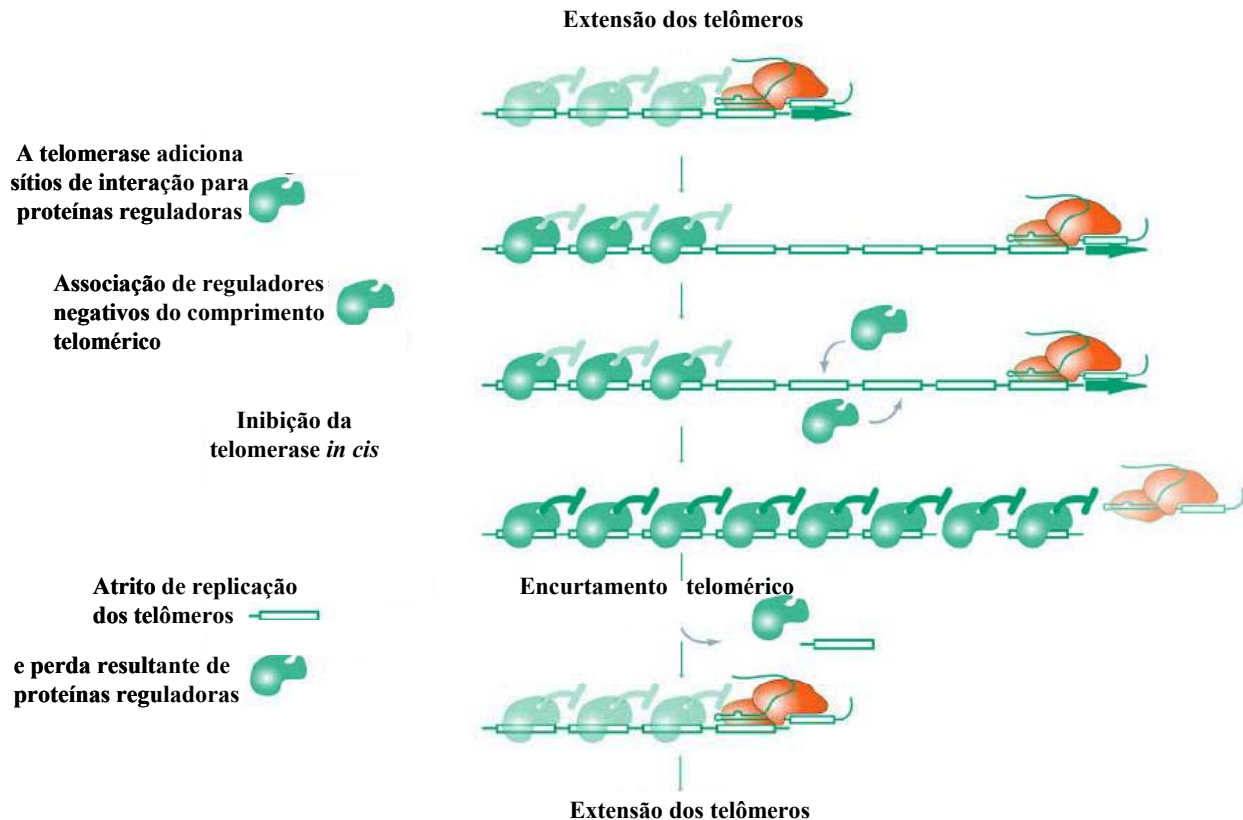


Figura 16. Controle do tamanho dos telômeros e da atividade da telomerase. A figura representa os princípios da regulação *in cis* do tamanho dos telômeros por fatores que se associam aos mesmos e a regulação negativa da atividade da telomerase nos telômeros individuais. Quando os telômeros ficam compridos, a extensão dos mesmos pela telomerase é inibida progressivamente. Este é um processo estocástico e impreciso que mantém o tamanho dos telômeros dentro de limites amplos. O controle do tamanho dos telômeros envolve um mecanismo de controle negativo no qual a adição de novas repetições teloméricas pela telomerase cria sítios de interação para os reguladores da atividade dessa enzima, exemplos de reguladores negativos que atuam *in cis* são os complexos Trf1 em mamíferos e Rap1/Rif1/Rif2 em *S. cerevisiae*. **Ilustração retirada de:** [122].

Além do papel fundamental da proteína Cdc13 como regulador positivo na manutenção dos telômeros, ela também limita a elongação telomérica. Isso foi deduzido a partir do fenótipo de elongação telomérica de algumas mutações em *CDC13* ou no gene para a sua interação com a proteína Stn1. Chandra e cols. propuseram um modelo de duas etapas no qual Cdc13 recruta primeiramente a telomerase para o telômero através da interação com a proteína Est1, e em seguida se associa com a proteína Stn1 promovendo a síntese da fita C e assim inibindo a telomerase e limitando a elongação do telômero [167].

Um dos principais desafios com respeito ao controle do tamanho telomérico é determinar como as proteínas que se associam ao DNA telomérico na forma de dupla fita regulam a ação da telomerase. Isto se deve ao fato de que a enzima atua na projeção 3' rica em G que se encontra a uma distância considerável de muitos fatores reguladores, tais como Trf1 (em humanos) e Rap1 (em leveduras). Uma análise recente da proteína de humanos Pot1, ajudou a esclarecer essa dúvida. Pot1 foi identificada com base na sua similaridade de sequência com proteínas que se associam ao DNA telomérico na forma de simples fita em ciliados e leveduras. A versão de Pot1 em humanos tem um domínio de associação ao DNA simples fita ("OB fold") na região N-terminal, que permite que essa proteína se associe à sequência 5'-TAGGGTTAG-3' com alto grau de especificidade [136]. *In vivo*, Pot1 se associa com os telômeros e essa associação é diminuída quando a proteína Trf2 é inibida, uma situação que leva à degradação da projeção 3' rica em G. Esses dados demonstram que a proteína Pot1 se associa ao DNA telomérico simples fita, porém, quando Pot1 está truncada na região N-terminal, perdendo assim o domínio de associação ao DNA, pode associar-se aos telômeros, demonstrando que a propriedade de interação a simples fita não é necessária para a associação dessa proteína com os telômeros. Esse segundo mecanismo para a associação de Pot1 aos telômeros depende da interação com o complexo Trf1 o qual é muito importante no controle do tamanho telomérico em humanos [168]. Quando os telômeros ficam mais compridos, mais complexo Trf1 está presente nos terminais dos cromossomos, aumentando a possibilidade de que Pot1 se associe ao DNA telomérico simples fita, isso bloqueia o acesso da telomerase. Um outro modelo está baseado na arquitetura dos telômeros de mamíferos, os quais apresentam estruturas conhecidas como "T-loop" [49] (Figura 14B). Na configuração do "T-loop" a projeção 3' rica em G, substrato para a telomerase alongar os telômeros, pode parear com sequências da fita rica em C formando uma estrutura em "D loop", e assim se tornar inacessível à telomerase. Pot1 se associa às repetições 5'-TTAGGG-3' na base dos "T-loop" ("D loop"), estabilizando essa estrutura e bloqueando o acesso da telomerase à projeção terminal 3' rica em G [122]. Portanto, comparativamente Pot1 é similar a Cdc13 de *S. cerevisiae* pois ambas proteínas utilizam um motivo do tipo "OB-fold" para associar-se ao DNA telomérico simples fita. Essas proteínas exercem papel fundamental na proteção dos terminais dos cromossomos de degradação e no recrutamento da telomerase.

O presente trabalho visa à identificação de proteínas com função homóloga a Pot1 e Cdc13 nos telômeros de *Leishmania (L.) amazonensis* com visos a se compreender a importância dessas estruturas na manutenção da vida parasitária.

2. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose é uma doença mundial sendo considerada pela OMS (www.who.int/health_topics/leishmaniasis/) uma doença de categoria I, junto com outras doenças emergentes ainda não controladas como a dengue e as tripanossomíases africanas. Segundo dados atuais dessa organização a doença é endêmica em 88 países em 4 continentes dos quais 72 são países em desenvolvimento e 13 estão entre os menos desenvolvidos (Figura 17). A prevalência global é de 12 milhões de pessoas e a população em risco é de 350 milhões.

Nas Américas e particularmente na América do Sul existe uma entidade denominada **leishmaniose tegumentar americana** (LTA), que agrupa três formas clínicas de leishmaniose: cutânea, muco-cutânea e cutânea difusa. A LTA encontra-se, segundo a OMS, entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância mundial, no Brasil de 1987 a 1996 foram notificados em média 28.000 casos anuais, e entre os anos 1980 e 2001, a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) registrou 760 mil casos da doença, atingindo 41% dos municípios brasileiros, especialmente nas regiões Nordeste, Norte, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (estado do Paraná), caminhando para ampla endemicidade [169]. A incidência da doença no estado de São Paulo vem aumentando, embora ainda não existam notificações de casos na cidade de São Paulo.

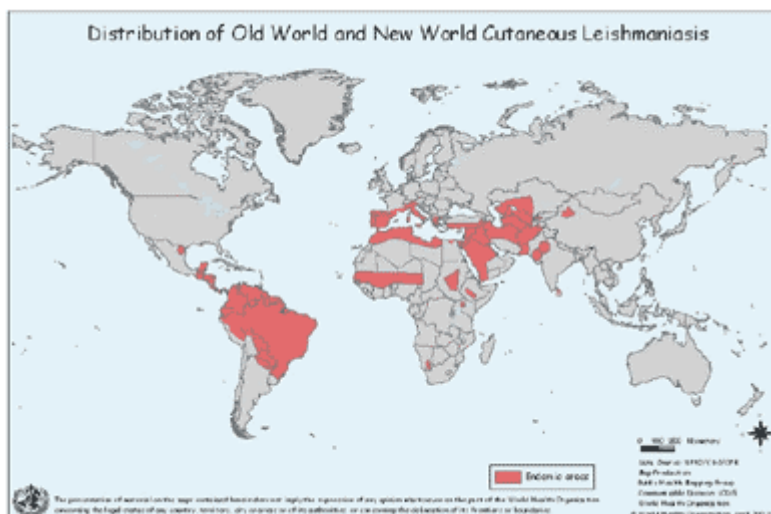


Figura 17. Distribuição da leishmaniose cutânea no Velho Mundo e no Novo Mundo. Em vermelho as regiões endêmicas da doença.

Ilustração retirada de: www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/

Os telômeros são estruturas especializadas localizadas nas extremidades dos cromossomos de organismos eucariotos, que funcionam na manutenção e na estabilidade do genoma da maioria desses organismos. Eles são constituídos por seqüências de DNA repetidas em *tandem* associadas a proteínas [48]. Em *Leishmania* spp. muito pouco se conhece sobre os fatores que compõem a cromatina telomérica e é precisamente por esse motivo que decidimos estudar a estrutura dos telômeros em *Leishmania (L.) amazonensis*, um dos principais agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar americana no Brasil. Apesar de apresentar elevada prevalência mundial, poucos avanços foram obtidos até hoje no tratamento dessa doença, ainda não se tem um composto que apresente um bom índice terapêutico e uma baixa toxicidade, além disso, as medidas para o controle dos vetores e tratamento de pacientes levaram ao aparecimento de parasitas e vetores resistentes. Conseqüentemente o maior conhecimento sobre a biologia molecular e celular destes protozoários facilitará o descobrimento de alvos parasita-específicos para o desenvolvimento de vacinas e de novas drogas hoje consideradas pontos prioritários para a erradicação da doença. Nosso intuito é o de utilizar componentes específicos da cromatina telomérica do parasita como alvos para o futuro desenvolvimento de drogas ou terapias antiparasitárias.

3. OBJETIVOS

- Identificar e caracterizar, mediante estudos *in vitro*, proteínas que interagem formando complexos com a fita telomérica rica em G e/ou co-purificam com a atividade de telomerase de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.
- Estudar as interações dessas proteínas com oligonucleotídeos de seqüências teloméricas.
- Purificar as proteínas que formam parte do complexo telomérico de *L. (L.) amazonensis* e determinar as suas propriedades físico-químicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ORIGEM DOS REAGENTES E MATERIAIS

- **Alkimia:** ácido acético glacial
- **Amersham Biosciences:** [α - 32 P]dGTP (3000 Ci/mmol), [γ - 32 P]ATP (6000 Ci/mmol), RNase A-livre de DNase, acrilamida, N,N'-metilene-bis-acrilamida, marcadores de tamanho molecular de DNA de 100 pb e de 1 Kb, marcador de peso molecular de proteínas "Rainbow", agarose, agarose de baixo ponto de fusão, agarose para PFGE, membrana de náilon Hybond N+, kit para marcação de DNA "Megaprime DNA Labelling System", colunas para cromatografia de filtração em gel Sephadex-G25, DNA de espermatozoide de salmão sonificado e desnaturado, enzimas de restrição: *Ava*II, *Not*I, *Sal*I, *Afa*I, *Mbo*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV e *Hind*III, poly (dI-dC).poly (dI-dC), dNTPs, dATP, TTP, dGTP, fenol, X-Gal, IPTG, Tris, EDTA, glicerol, azul de bromofenol, SDS, sarkosil, brometo de etídio, DNA de fago λ , ampicilina, 2-mercaptoetanol, TEMED, persulfato de amônio, enzima polinucleotídeo quinase do bacteriófago T4, uréia, proteinase K, guanidina-HCl, NH_4HCO_3
- **Amicon:** filtros Centricon YM-30
- **Applied Biosystems:** kit "Big Dye Terminator" versão 3.0, peptídeos padrões para MALDI-TOF ("Sequazyme Peptide Mass Standards Kit, Calibration Mixture 1 and 2")
- **Axigem:** tubos de 0,5 mL e 1 mL siliconizados
- **Bio-Rad:** blocos de agarose contendo cromossomos de *S. cerevisiae* e *Hansenula wingei*, reagente de Bradford concentrado, resina para cromatografia de troca iônica DEAE-agarose Bio-Gel A, triton X-100, DTT, xileno cianol, suportes descartáveis de 2 mL para colunas cromatográficas
- **Calbiochem:** DMSO, inibidores de proteases "cocktail set III", espermina, espermidina, tween 20, EGTA, CaCl_2 , BSA, NP-40, Hepes, corante DAPI
- **Chemco:** MgCl_2 , NaOAc
- **Costar:** colunas para filtração "Spin X"
- **Cultilab:** soro fetal bovino
- **Difco:** bacto-triptona, extrato de levedura, ágar bacteriológico

- **Eppendorf:** kit para purificação de DNA "Perfectprep gel Cleanup kit", kit para mini-preparações de DNA plasmidial "Perfectprep® Plasmid Mini"
- **Index:** clorofórmio
- **Invitrogen:** "Taq DNA Polymerase Recombinant" e "Platinum Taq DNA Polymerase" (com MgCl_2 e 1X tampão de PCR sem MgCl_2), "Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity" (com MgSO_4 e 1X tampão de PCR sem MgSO_4), Trizol[®], colunas de oligo dT para cromatografia de afinidade "MessageMaker[®] Reagent Assembly", kit para síntese de cDNA "SuperScript[™] Choice System", colunas para cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-500 HR, kit de clonagem: "TOPO-TA Cloning-pCR 2.1 TOPO"
- **Kodak:** filmes X-Omat
- **Gibco-BRL:** solução de antibióticos/antimicótico
- **Merck:** EtOH, formaldeído, MeCN, ácido fórmico, H_3PO_4 , acetona
- **Millipore:** Ponteiros "zip tip" C-18, membranas de 0,2 μM para filtração, filtros de seringa de 0,2 μM e 0,45 μM
- **OPERON e MWG:** oligonucleotídeos sintéticos
- **Pierce:** resina para cromatografia de afinidade "Ultralink Immobilized Neutravidin[™] Plus"
- **Promega:** tripsina ("sequencing grade porcine trypsin")
- **SARDI:** líquido de cintilação
- **Sigma:** meio de cultura para *Leishmania* spp. "Schneider's Insect Médium", corante azul de Coomassie R-250
- **Synth:** glicose, álcool isoamílico, ácido bórico, citrato de sódio, HCl, NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , LiCl, KOAc, NaOH, MeOH, NH_4Oac , NaHCO_3
- **Waters:** colunas para cromatografia de fase reversa Sep-Pak C18, micro-colunas para cromatografia de fase reversa C18, coluna capilar PepMap C18, capilares para CapLC
- **Whatman:** papel de filtro 3MM
- **Corning:** frascos plásticos de 25 cm^3 para cultura

4.2. SOLUÇÕES E TAMPÕES

- **Tampão A:** 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EGTA, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0; 1 mM espermidina; 0,3 M espermina; 5 mM 2-mercaptoetanol
- **1X TMG:** 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,2 mM $MgCl_2$; 10% glicerol (v/v)
- **0,5X TBE** (pH 8,3): 44,5 mM Tris base; 44,5 mM ácido bórico; 1 mM EDTA, pH 8,0
- **1X TBE** (pH 8,3): 89 mM Tris base; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA, pH 8,0
- **Tampão E:** 100 mM KCl; 0,1% NP-40 (v/v); 25 mM Hepes, pH 7,5; 5 mM $MgCl_2$; 0,1 mM EDTA, pH 8,0; 10% glicerol (v/v); 0,5 mM DTT
- **1X tampão de TRAP:** 20 mM Tris-HCl, pH 8,3; 1,5 mM $MgCl_2$; 63 mM KCl; 0,005% Tween 20 (v/v); 1 mM EGTA, pH 8,0
- **1X tampão de telomerase:** 50 mM Tris-HCl, pH 8,3; 1 mM DTT; 1 mM espermidina; 1 mM $MgCl_2$
- **1X PBS** (pH 7,4): 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; 2 mM KH_2PO_4
- **1X PBSG:** 1X PBS suplementado com 2% glicose (p/v)
- **Solução TELT:** 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA, pH 8,0; 100 mM LiCl; 0,1% Triton X-100 (v/v)
- **1X TE:** 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0
- **0,5X TAE:** 40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0
- **6X tampão de amostra para DNA:** 30% glicerol (v/v); 0,25% xileno cianol (p/v); 0,25% azul de bromofenol (p/v); 10 mM EDTA, pH 8,0
- **Tampão de lise (PFGE):** 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 M EDTA, pH 8,0; 1% sarkosil (p/v); 1 mg/mL de proteinase K adicionada imediatamente antes do uso
- **Tampão fosfato de sódio:** 0,5 M Na_2HPO_4 ; 0,34% H_3PO_4 (v/v)
- **Solução de pré-hibridização:** 0,5 M tampão fosfato de sódio, pH 7,2; 1 mM EDTA, pH 8,0; 7% SDS (p/v); 1% BSA (p/v), 100 μ g/mL de DNA de espermatozoides de salmão sonificado e desnaturado
- **1X SSC** (pH 7,0): 0,15 M NaCl; 0,015 M citrato de sódio
- **20X SSC** (pH 7,0): 3 M NaCl; 0,3 M citrato e sódio
- **Solução de lavagem 1:** 2X SSC; 0,1% SDS (p/v)

- **Solução de lavagem 2:** 40 mM tampão fosfato de sódio, pH 7,2; 1 mM EDTA, pH 8,0; 1% SDS (p/v)
- **Solução de desnaturação:** 1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH
- **Solução de neutralização:** 1,5 M NaCl; 1 M Tris-HCl, pH 8,0
- **5X tampão de amostra para proteínas:** 0,25 M Tris-HCl, pH 6,8; 10% SDS (p/v); 0,5% azul de bromofenol (p/v); 50% glicerol (v/v); 0,5 M 2-mercaptoetanol
- **1X tampão de interação:** 25 mM Hepes, pH 7,5; 5 mM MgCl₂; 0,1 mM EDTA, pH 8,0; 10% glicerol (v/v); 0,5 mM DTT
- **Solução fixadora:** 17% EtOH (v/v); 0,7% ácido acético glacial (v/v)
- **Solução para transferência alcalina:** 1 M NaOH, 1 M NaCl
- **Solução neutralizante (para transferência alcalina):** 0,5 M Tris-HCl, pH 7,2; 1 M NaCl
- **Solução de tripsina A:** 1 µL de solução de tripsina (1 µg/µL em tampão pH 1,0) para 80 µL de 50 mM NH₄HCO₃
- **Solução de tripsina B:** 1 µL de solução de tripsina (1 µg/µL em tampão pH 1,0) para 240 µL de 50 mM NH₄HCO₃
- **Tampão de eluição de proteínas modificado:** 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,1% SDS p/v; 1 mM DTT; 0,2 mM EDTA, pH 8,0; 0,1 mg/mL BSA; 2,5% glicerol v/v
- **Tampão de diluição de proteínas:** 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl; 1 mM DTT; 0,1 mM EDTA, pH 8,0; 20% glicerol v/v; 0,1 mg/mL BSA
- **Tampão de diluição de proteínas contendo guanidina-HCl:** 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl; 1 mM DTT; 0,1 mM EDTA, pH 8,0; 20% glicerol v/v; 0,1 mg/mL BSA; 6 M guanidina-HCl

4.3. MEIOS DE CULTURA

4.3.1. *L. (L.) amazonensis*

Meio de cultura "Schneider's Insect Medium", pH 6,5; suplementado com 5,4 mM CaCl₂; 4,76 mM NaHCO₃; 5% soro fetal bovino inativado (v/v) e 1X solução de antibióticos (penicilina e estreptomicina)/antimicótico (anfotericina B).

4.3.2. *Escherichia coli*

- **Meio SOB** (pH 7,4): bacto-triptona 20 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 0,5 g/L
- **Meio SOC**: meio SOB suplementado com 20 mM de glicose, 10 mM MgCl₂
- **Meio LB líquido** (pH 7,4): bacto-triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L. Se precisar do meio sólido adicionar ao meio líquido 15 g/L de ágar bacteriológico. Quando precisar suplementar com 50 µg/mL de ampicilina.
- **Meio FB**: 100 mM KCl, 50 mM CaCl₂, 10 mM KOAc, 10% glicerol (v/v)

4.4. OLIGONUCLEOTÍDEOS

4.4.1. Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de TRAP

- **NT**: 5'-ATCGCTTCTCGGCCTTTT-3'
- **TSNT**: 5'-ATCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-3'
- **TS**: 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'
- **ACX**: 5'-GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC-3'
- **R8**: 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTAG(GGTTAG)₇-3'
- **Cx-Ext**: 5'-GTGCCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3'

4.4.2. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para a amplificação do gene *LaRpa-1*

- **Iniciador 1 (senso)**: 5'-ATGCAGCAGCCAGGCAGCCAC-3'
- **Iniciador 2 (antisenso)**: 5'-TCAGACGTAAGCCTCGATGAG-3'
- **Iniciador 3 (senso)**: 5'-GCAACGGTCTTCAACGACGCC-3'
- **Iniciador 4 (antisenso)**: 5'-GGCGTCCTGCTTGAAGTAGAT-3'

4.4.3. Oligonucleotídeos iniciadores do vetor M13 utilizados no seqüenciamento dos DNAs extraídos dos plasmídeos recombinantes

- **Iniciador M13 senso:** 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
- **Iniciador M13 antisense:** 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

4.4.4. Oligonucleotídeos utilizados na caracterização adicional do complexo proteína- DNA telomérico de *L. (L.) amazonensis* LaGT1

- **Tel30:** 5'-(TTAGGG)₅-3'
- **Tel36:** 5'-(GTTAGG)₆-3'

4.5. PARASITAS, BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

- **Parasitas**

Promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* cepa MHOM/BR/73/M2269

- **Bactérias**

DH5 α genótipo F λ Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(r_k-m_k+) deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1

- **Plasmídeos**

Vetor de clonagem pCR 2.1 TOPO

4.6. APARELHOS

- Aparelho de PCR: Peltier Thermal Cycler (MJ Research)
- Espectrofotômetro: Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech)
- Centrífuga: Sorvall Super T21 (Kendro Laboratory Products)
- Ultracentrífuga: OptimaTM LE 80K (Beckman)
- Fotodocumentador: Image Master VDS (Amersham Biosciences)

- Seqüenciador: ABI 377 (Applied Biosystems)
- Aparelho de PFGE: "Gene Navigator" (Amersham Biosciences)
- Aparelho UV cross-linker: (ULTRALUM)
- Contador de radiações β : LS 6000 TA (Beckman)
- Concentrador a vácuo: Vacufuge (Eppendorf)
- Aparelhos para MALDI-TOF: Voyager-DE PRO mass spectrometer (PerSeptive Biosystems) e MALDI LR instrument (Micromass)
- Espectrômetro de massa: Q-ToF (Micromass)
- Fluorímetro: Aminco Bowman Series 2 (SLM-AMINCO)

4.7 ENSAIO PARA DETECTAR ATIVIDADE DE TELOMERASE ("TELOMERIC REPEAT AMPLIFICATION PROTOCOL":TRAP) EM EXTRATOS PROTÉICOS DE *L. (L.) amazonensis*

4.7.1. Ensaio "One Tube TRAP"

As frações protéicas semi-purificadas em coluna de troca iônica DEAE-agarose (detalhes no item 5.1) foram testadas para atividade de telomerase utilizando-se a variante "One Tube TRAP" do ensaio TRAP com modificações do protocolo original [77], que incluem os oligonucleotídeos NT e TSNT (item 4.4.1) para a obtenção do controle interno de 36 pb da reação de PCR [170]. É importante assinalar que neste ensaio as reações de telomerase e PCR são realizadas em um mesmo tubo. A reação foi conduzida sob as condições descritas por Cano e col. [65], em resumo: 1 μ g de cada fração protéica foi misturada com os oligonucleotídeos TS (senso) e ACX (antisenso) (item 4.4.1), na presença de 1X tampão de TRAP (item 4.2), 200 μ M de uma mistura de dNTPs, 0,3 μ l de [α - 32 P]dGTP (3000 Ci/mmol) e 1 U de "Platinum *Taq* DNA Polymerase", em um volume final de 25 μ L. As amostras foram incubadas por 1 h a 28 °C para permitir a extensão do oligonucleotídeo TS pela telomerase seguido da reação de PCR realizada utilizando-se o programa seguinte: 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C e 30 s a 72 °C, e 1 ciclo de 7 min a 72 °C. Para testar a processividade da telomerase 1 fmol/ μ L do oligonucleotídeo R8 (item 4.4.1) foi utilizado como controle de elongação do oligonucleotídeo TS, conforme

descrito [170]. Os produtos foram fracionados em gel não desnaturante 12,5% v/v (19:1, acrilamida:bis-acrilamida, p/p) em 1X TBE (item 4.2), a 600 V durante ~3 h e expostos em filme X-Omat por 24 h a -80 °C. Para confirmar a presença de atividade de telomerase nos extratos, estes foram pré-incubados com 50-200 ng de RNase A-livre de DNase por 5 min a 37 °C ou com 10 µg de proteinase K por 10 min a 56 °C. Como controles foram usadas reações onde omitiu-se o extrato protéico (NE).

4.7.2. Ensaio "Two Tube TRAP"

As frações obtidas pela cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-agarose dos extratos protéicos S100 e nuclear e as frações obtidas pela cromatografia de afinidade (de talhes no item 5.1) foram testadas para atividade de telomerase, conforme descrito por Cano e col. [65]. Em resumo: a primeira etapa consistiu no ensaio de telomerase onde 1 µg de cada fração protéica foi misturada com 40 pmol do oligonucleotídeo TS, na presença de 1X tampão de telomerase (item 4.2), 2 mM dATP, 2 mM TTP, 10 µM dGTP, em um volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas por 1 h a 28 °C para permitir a extensão do oligonucleotídeo TS pela telomerase. Posteriormente, a metade do volume de reação foi transferido para um segundo tubo onde realizou-se a reação de PCR na presença de 20 pmol do oligonucleotídeo TS (senso), 25 pmol do oligonucleotídeo Cx-ext (antisenso) (item 4.4.1), 1X tampão de TRAP (item 4.2), 200 µM da mistura de dNTPs, 0,3 µl de [α -³²P]dGTP (3000 Ci/mmol) e 1 U de "Platinum *Taq* DNA Polymerase", em um volume final de 25 µL. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o mesmo programa e controles utilizados no ensaio "One Tube TRAP" (item 4.7.1). Os produtos foram fracionados em gel desnaturante contendo 7 M uréia, 12% v/v (19:1, acrilamida:bis-acrilamida, p/p) em 1X TBE (item 4.2), a 600 V por ~3 h e expostos em filme X-Omat por 24 h a -80 °C.

A presença de atividade de telomerase nas frações obtidas pela cromatografia de afinidade foi confirmada pré-incubado-se as mesmas com 1 µg de RNase A-livre de DNase por 5 min a 37 °C ou com 10 µg de proteinase K por 10 min a 56 °C. Como controles negativos foram usadas reações onde omitiu-se o extrato protéico (NE) ou o oligonucleotídeo TS (NTS).

4.8. SEQUENCIAMENTO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DAS PROTEÍNAS QUE FORMAM OS COMPLEXOS LAGT1-LAGT3 DE *L. (L.) amazonensis*

4.8.1. Preparação das amostras protéicas

As proteínas que formam os complexos LaGT2 e LaGT3 purificadas por cromatografia de afinidade, foram fracionadas por SDS-PAGE previamente ao sequenciamento, enquanto o complexo LaGT1 foi cortado e retirado do gel após irradiação *in situ* com luz UV (item 5.1).

A primeira etapa consistiu na digestão enzimática com tripsina, em gel. Para isto as bandas de interesse foram cortadas e retiradas do gel de SDS-PAGE, lavadas com 60 µL de solução contendo 50% de MeCN (v/v) e 25 mM de NH_4HCO_3 por 10 min e depois com 60 µL de H_2O por 10 min. Após as lavagens, as mesmas foram maceradas e desidratadas duas vezes com 50 µL de MeCN absoluto por 10 min e posteriormente em um concentrador a vácuo (item 4.6) por ~40 min a t.a. Após desidratação as amostras protéicas foram tripsinizadas, utilizando-se uma solução de tripsina A (item 4.2): 7,5-30 µL de solução dependendo da quantidade de gel, e posteriormente outra de tripsina B (item 4.2): 15-70 µL de solução dependendo da quantidade de gel, e incubadas por 40 min a 4 °C e depois 16 h em banho a 37 °C. A segunda etapa consistiu na extração dos peptídeos como a seguir: as amostras foram centrifugadas a 10600 g por 1 min a t.a. e a elas foram adicionados 50 µL de uma solução de 20 mM de NH_4HCO_3 seguido de incubação por 20 min a t.a. A fase líquida foi coletada em um tubo novo de 1,5 mL contendo 30 µL de uma solução de 50% de MeCN (v/v) e 5% de ácido fórmico (v/v). Adicionou-se novamente a amostra 60 µL da solução de 50% de MeCN (v/v) e 5% de ácido fórmico (v/v), incubando-se por 15 min a t.a., a fase líquida foi coletada e misturada com a anterior. Finalmente, a fase líquida foi seca utilizando-se um concentrador a vácuo (item 4.6) e congelada até seu uso a -20 °C.

4.8.2. Sequenciamento dos peptídeos por LC/ESI-MS/MS

Os peptídeos foram sequenciados por ionização por nano-electrospray positivo (nano-ESI), utilizando-se um sistema de cromatografia líquida capilar (CapLC) acoplado a um espectrômetro de massa. Para o sequenciamento, as amostras foram desalinizadas utilizando-se

micro-colunas cromatográficas de fase reversa C18 "Trap Column" (item 4.1) e os peptídeos desalinizados foram separados usando-se uma coluna capilar PepMap C18 (item 4.1). Os experimentos foram realizados usando-se o método de aquisição dependente de dados. As condições típicas foram: capilar a 3 kV, cone a 40 V e temperatura do bloco de 80 °C. O sequenciamento dos peptídeos foi determinado manualmente a partir dos espectros de massa dos íons produzidos por ESI-MS/MS com a ajuda do programa PepSeq da Micromass (www.micromass.com). O aparelho foi calibrado utilizando-se uma solução de 0.1% de H₃PO₄ v/v.

4.9. PURIFICAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS SINTÉTICOS

Todos os oligonucleotídeos sintéticos utilizados durante o desenvolvimento deste projeto foram previamente purificados para eliminar os produtos de síntese incompleta. Primeiramente, eles foram ressuspensos em H₂O para uma concentração final de 1 mM, a metade (500 µM) foi purificada em gel desnaturante contendo 7 M uréia, 15% v/v (19:1, acrilamida:bis-acrilamida, p/p) em 1X TBE (item 4.2), utilizando-se corrida eletroforética a 600 V durante ~3 h, e expostos em filme X-Omat por 30 min a t.a. Como controles foram utilizados os mesmos oligonucleotídeos marcados radioativamente no terminal 5' (item 4.10.2). Os oligonucleotídeos não marcados foram cortados e retirados do gel, macerados e eluídos com H₂O por 24 h a t.a. Posteriormente foram purificados utilizando-se cromatografia de fase reversa em colunas Sep-Pak C18 (item 4.1) segundo protocolo descrito por Sambrook e col. [171]. Para determinar a concentração dos oligonucleotídeos purificados usamos determinação da absorbância (DO_{260nm}) em espectrofotômetro com luz UV (item 4.6).

4.10. MARCAÇÃO RADIOATIVA DE FRAGMENTOS DE DNA E OLIGONUCLEOTÍDEOS PREVIAMENTE PURIFICADOS

4.10.1. Marcação do fragmento de DNA que contem a seqüência interna do gene *LaRpa-1* por "random primer extension"

Para a realização dos "Southern-blottings" (item 4.13.1.3 e item 4.13.2.2) o fragmento de DNA que contem a sequência interna do gene *LaRpa-I* (0,741 Kb) foi marcado com 50 μCi de [α - ^{32}P]dGTP (3000 Ci/mmol) usando-se o kit "Megaprime DNA Labelling System" (item 4.1) seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante (Amersham Biosciences). Os isótopos não incorporados foram separados da sonda marcada por cromatografia de filtração em gel em microcoluna Sephadex-G25 (item 4.1).

4.10.2. Marcação do terminal 5' dos oligonucleotídeos por fosforilação radioativa

Os oligonucleotídeos (100 pmol) previamente purificados (item 4.9) utilizados para os ensaios de EMSA e "UV cross-linking" foram marcados com 50 μCi [γ - ^{32}P]ATP (6000 Ci/mmol) segundo o protocolo descrito por Sambrook e col. [171] utilizando-se a enzima polinucleotídeo quinase do bacteriófago T4 a qual catalisa a transferência do γ - ^{32}P a partir do [γ - ^{32}P]ATP para o terminal 5' do DNA. Para purificá-los e assim eliminar os isótopos não incorporados, os oligonucleotídeos marcados foram fracionados em gel desnaturante contendo 7 M uréia 15% v/v (19:1, acrilamida:bis-acrilamida, p/p) em 1X TBE (item 4.2) a 600 V durante ~3 h, e expostos em filme X-Omat por 30 min a t.a. As bandas correspondentes a cada oligonucleotídeo foram cortadas e retiradas do gel, maceradas e eluídas com H_2O por 24 h a t.a. seguido de contagem em contador de radiações β (item 4.6), para isto 1 μL da solução contendo o oligonucleotídeo marcado foi diluído em 5 mL de líquido de cintilação e a leitura foi realizada em cpm/ μL .

4.11. CARACTERIZAÇÃO ADICIONAL DOS COMPLEXOS PROTEÍNA-DNA TELOMÉRICO: LaGT1-LaGT3 DE *L. (L.) amazonensis*

4.11.1. Análise da interação da proteína que forma o complexo LaGT1 com o DNA telomérico

Para analisar a interação da proteína que forma o complexo LaGT1 com o DNA telomérico de *L. (L.) amazonensis* foram realizados testes de interação (reações *in vitro* de interação proteína-DNA) seguido de fracionamento dos complexos em gel ("Electrophoretic

mobility shift assay": EMSA) segundo Fernández e col. (item 5.1) . Para isso, utilizou-se a fração de 400 mM de NaOAc da coluna de DEAE-agarose do extrato S100 e os oligonucleotídeos de sequência telomérica Tel1-Tel6 (Tabela 1 do item 5.1), Tel30 e Tel36 (item 4.4.4) marcados radioativamente no terminal 5' (item 4.10.2). As frações foram testadas por EMSA e "UV cross-linking".

4.11.2. Estimativa das constantes de dissociação (K_d) dos complexos LaGT1-LaGT3 com seqüências teloméricas de *L. (L.) amazonensis* ricas em G na forma de DNA e RNA

Ensaio de EMSA foram realizados utilizando-se diluições seriadas em duplicata das frações semipurificadas por DEAE (para LaGT1 frações de 400 mM NaOAc do extrato S100 e de 500 mM NaOAc do extrato nuclear) e por afinidade (para LaGT2, fração de 0,6 M de KCl e para LaGT3, fração de 2,2 M de KCl, do extrato S100) que contêm as proteínas que formam os respectivos complexos, e os oligonucleotídeos Tel6 e Tel6RNA (Tabela 1 do item 5.1), marcados radioativamente no terminal 5' (item 4.10.2). Análises quantitativas dos experimentos (% dos oligonucleotídeos Tel6 e Tel6RNA ligados e não ligados às respectivas proteínas) foram realizadas utilizando-se o programa Scion Image para Windows (www.scioncorp.com). Os resultados foram plotados em gráfico de regressão não linear e as K_d ($[proteína][DNA]/[proteína-DNA]$) foram estimadas utilizando-se o programa GraphPad Prism (version 4.0, 2003; www.graphpad.com) e segundo Lu e col. [172] e Sabatini e col. [173].

4.11.3. Renaturação das proteínas que formam parte dos complexos LaGT2 e LaGT3 de *L. (L.) amazonensis*

Os experimentos de renaturação das proteínas que formam parte dos complexos LaGT2 e LaGT3 foram realizados segundo o protocolo descrito por Hager e Burgess [174] com algumas modificações como segue: as proteínas purificadas por cromatografia de afinidade foram separadas por SDS-PAGE em gel 12% e coradas com azul de Coomassie R-250. As bandas correspondentes às proteínas foram cortadas e retiradas do gel, lavadas com H₂O, maceradas e eluídas em 1 mL de tampão de eluição de proteínas modificado (item 4.2) por 16 h a t.a. A solução contendo as diferentes proteínas eluídas foi separada do gel por filtração usando-se

colunas Spin X (item 4.1). Posteriormente, as proteínas foram precipitadas com 4 volumes de acetona pura por 2 h a -20°C e a seguir foram centrifugadas a 10600 g por 10 min a 4°C . Os precipitados foram lavados 1 vez com 0,5 mL de MeOH puro a -20°C , secos a t.a. e ressuspensos em 20 μL de tampão de diluição de proteínas contendo 6 M guanidina-HCl (item 4.2) por 20 min a t.a. A seguir, essa solução foi diluída 50 vezes em tampão de diluição de proteínas (item 4.1) por 12 h a t.a. A atividade de interação das proteínas renaturadas com o DNA telomérico foi analisada mediante ensaios de "UV cross-linking".

4.11.4. Análise conformacional da proteína LaRpa-1 ligada e não ligada à sequência telomérica rica em G de *L. (L.) amazonensis* por espectroscopia de fluorescência

Este ensaio foi realizado com a proteína LaRpa-1 renaturada segundo protocolo descrito no item anterior (4.11.3), na presença ou ausência de um excesso de oligonucleotídeo de sequência telomérica Tel6 (50 fmol) (Tabela 1 do item 5.1). A quantidade de proteína utilizada para renaturação foi de ~ 500 ng. Após a renaturação a proteína foi recuperada em baixa concentração, sendo impossível estimar a quantidade total usada no ensaio de fluorescência. Este ensaio foi realizado no laboratório de Biofísica Molecular no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em colaboração com o Professor Dr. Carlos Henrique I. Ramos. Para a análise do espectro de emissão de fluorescência foi utilizado o fluorímetro descrito no item 4.6, usando-se cubetas de 1 x 1 cm. O comprimento de onda de excitação usado foi 295 nm com banda de excitação de 4 nm e banda de emissão de 16 nm. O espectro de emissão foi tomado desde 320 até 380 nm a 23°C . Os dados da fluorescência foram analisados com base no centro de massa espectral ($\langle\lambda\rangle$) como descrito na equação seguinte: $\langle\lambda\rangle = \sum \lambda_i F_i / \sum F_i$ (Eq. 1). Onde λ_i é o comprimento de onda e F_i é a intensidade da fluorescência λ_i . Todos os dados foram analisados usando-se o programa Origin (Microcal). Coletou-se dados da emissão de fluorescência da proteína na presença e na ausência de DNA assim como individualmente do tampão e do DNA.

4.12. CLONAGEM DO GENE *LaRpa-1*

4.12.1. Extração de DNA genômico de *L. (L.) amazonensis*

O DNA genômico de *L. (L.) amazonensis* foi extraído de promastigotas provenientes de cultura em fase exponencial de crescimento (cultura de 3 dias). Os parasitas foram separados do meio de cultura "Schneider's Insect Medium" (item 4.3.1), por centrifugação a 10600 g por 30 s a t.a., lavados 2 vezes em solução de 1X PBSG (item 4.2). Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em solução TELT (item 4.2), essa mistura foi gentilmente homogeneizada e incubada por 5 min a t.a. Posteriormente, foram realizadas de 2 a 3 extrações dos ácidos nucleicos com fenol:clorofórmio (1:1) v/v e 1 extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) v/v. Os mesmos foram precipitados usando-se uma solução de 0,3 M de NaOAc, pH 5,2 em EtOH absoluto, ressuspensos em 1X TE (item 4.2) e tratados com 10 µg de RNase A-livre de DNase por 15 min a 37 °C. Realizamos então uma nova extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) v/v seguida de precipitação do DNA com 0,3 M de NaOAc, pH 5,2 em EtOH absoluto. O excesso de sal do DNA foi retirado lavando-se o sedimento com 70% de EtOH gelado (v/v) a 8153,84 g por 30 min a 4 °C. Os DNAs foram ressuspensos em 1X TE (item 4.2). A qualidade da extração e a concentração de DNA em cada amostra foram estimadas utilizando-se corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% (p/v) corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) em 0,5X TAE (item 4.2). Utilizou-se como padrão de concentração o DNA de fago λ (não digerido) em diferentes concentrações molares ou determinação da absorbância (DO_{260nm}) em espectrofotômetro com luz UV (item 4.6) [171].

4.12.2. Síntese de cDNA a partir de mRNA de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

A síntese de cDNA a partir de mRNA utilizando-se o kit "SuperScriptTM Choice System"(item 4.1) foi realizada pela aluna de doutorado Cristina Braga de Brito Lira segundo recomendações do fabricante (Invitrogen). Um total de 3-5 x 10⁹ promastigotas de *L. (L.) amazonensis* obtidos de cultura em fase exponencial (3 dias de crescimento) foram utilizados para extração de RNA total com o reagente trizol. A quantidade de RNA total foi estimada a

partir da determinação da absorbância (DO_{260nm}) em espectrofotômetro com luz UV (item 4.6) e em gel desnaturante contendo formaldeído. A população de mRNA poli (A)+ (~1% do total), foi selecionada utilizando-se cromatografia de afinidade em coluna de oligo dT (item 4.1) e visualizada em gel desnaturante contendo formaldeído [171]. Os mRNAs poli (A)+ utilizados para a síntese do cDNA foram purificados por dupla seleção nas colunas de oligo dT. Populações mistas de cDNA "full lenght" foram sintetizadas por transcrição reversa dos mRNAs utilizando-se a enzima "SuperScript II RT", uma mistura de oligo (dT)₁₂₋₁₈ e iniciadores randômicos ("random primers"), de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen). Para a síntese da segunda fita foram utilizadas as enzimas: *E. coli* DNA polimerase I (40 U), em combinação com *E. coli* RNase H (2 U) e *E. coli* DNA ligase (10 U) (item 4.1). Em seguida, as moléculas de cDNA foram selecionadas por tamanho utilizando-se cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephacryl S-500 HR (item 4.1).

Após a síntese e seleção cromatográfica, estimou-se o tamanho das moléculas de cDNA contidas nas diferentes frações em gel não desnaturante 4% v/v (19:1, acrilamida-bisacrilamida, p/v). Foram utilizados marcadores de tamanho molecular de DNA de 100 pb e de 1 Kb. O gel foi colocado em solução fixadora (item 4.2) e em seguida corado com prata por 5 min a t.a.. Quando as bandas foram visualizadas colocou-se o gel novamente em solução fixadora (item 4.2). Antes de capturar-se a imagem em scanner o gel foi desidratado em uma solução contendo 25% de glicerina (v/v) e 75% de EtOH (v/v) (modificado de Sambrook e col. [171]).

4.12.3. Clonagem do gene *LaRpa-1* utilizando-se amplificação por PCR

O gene *LaRpa-1* foi amplificado por PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores desenhados a partir da sequência putativa do gene *LmRpa-1* (contig LmjF28-07-20031115_V2.0, função inferida por homologia, Projeto Genoma de *Leishmania*). Foram desenhados dois conjuntos de iniciadores (Figura 18 e item 4.4.2.)

1. **Iniciador 1 senso:** correspondente a região 5', nt 1 ao 21 e **Iniciador 2 antisenso:** correspondente a região 3', nt 1383 ao 1404.
2. **Iniciador 3 senso:** correspondente a região 5', nt 181 ao 202 e **Iniciador 4 antisenso:** correspondente a região 3', nt 900 ao 921.

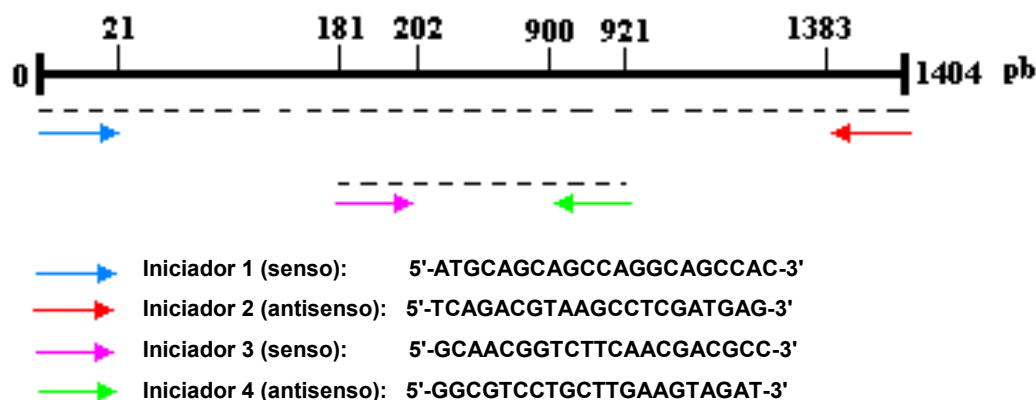


Figura 18. Esquema da localização dos oligonucleotídeos iniciadores na sequência putativa do gene *LmRpa-1*, utilizados na amplificação por PCR do gene *LaRpa-1*.

As condições da reação de PCR foram padronizadas utilizando-se os dois conjuntos de iniciadores. Para isto foram utilizados ~100 ng de DNA genômico de *L. (L.) amazonensis*, 1X tampão de PCR sem MgCl₂, 5 pmol de cada iniciador, 1 mM da mistura de dNTPs, 1 U de "Taq DNA Polymerase Recombinant", 10% DMSO (v/v) e diferentes concentrações de MgCl₂ (1,5-4 mM), em um volume final de 25 µL. As condições da amplificação foram: 35 ciclos de 2 min a 94 °C, 30 s a 52 °C e 2 min a 72 °C e 1 ciclo de 7 min a 72 °C (**Programa 1**). Com os iniciadores 1 e 2 foi necessário fazer uma segunda etapa de padronização utilizando-se concentrações menores de MgCl₂ (0,5-1,5 mM) e modificando-se as condições de amplificação: 1 ciclo de 2 min a 94 °C, 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C e 2 min a 72 °C seguido de 1 ciclo de 7 min a 72 °C (**Programa 2**). A sequência completa do gene *LaRpa-1* também foi amplificada, como descrito abaixo, a partir de cDNA dupla fita obtido a partir de mRNA de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (item 4.12.2).

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram analisados em gel de agarose 0,8% (p/v) em 0,5X TAE (item 4.2), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL). As amostras foram homogeneizadas em 6X tampão de amostra para DNA (item 4.2) até uma concentração final de 1X. Foram utilizados marcadores de tamanho molecular de DNA de 100 pb e de 1 Kb. Os géis foram submetidos a eletroforese por ~60 min. a 80 V e a seguir os mesmos foram fotografados sob luz UV usando-se fotodocumentador (item 4.6).

Os fragmentos de DNA a serem purificados foram amplificados por PCR como segue:

- 1) **Fragmento interno do gene *LaRpa-1***: ~100 ng de DNA genômico de *L. (L.) amazonensis*, 1X tampão de PCR sem MgSO_4 , 5 pmol de cada iniciador: 3 e 4, 1 mM da mistura de dNTPs, 1 U de "Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity", 10% DMSO (v/v) e 1,5 mM de MgSO_4 , em um volume final de 25 μL . Condições de amplificação: Programa 1.
- 2) **Gene *LaRpa-1*** (a partir de DNA genômico e a partir de cDNA): ~100 ng de DNA genômico e ~10 ng de cDNA dupla fita de *L. (L.) amazonensis* respectivamente, 1X tampão de PCR sem MgCl_2 , 5 pmol de cada iniciador: 1 e 2, 1 mM da mistura de dNTPs, 1 U de "Platinum *Taq* DNA Polymerase", 10% DMSO (v/v) e 0,75 mM de MgCl_2 , em um volume final de 25 μL . Condições de amplificação: Programa 2.

4.12.4. Purificação dos fragmentos de DNA amplificados por PCR

Os fragmentos de DNA resultantes da amplificação por PCR foram purificados a partir de gel de agarose 1% (p/v) em 1X TAE (item 4.2) contendo brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/mL}$), utilizando-se o kit "Perfectprep gel Cleanup" (item 4.1) de acordo com as instruções do fabricante (Eppendorf). A integridade e a concentração de cada fragmento de DNA purificado foram estimadas utilizando-se corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% (p/v) corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/mL}$) em 0,5X TAE (item 4.2). Como padrão de concentração utilizou-se o DNA de fago λ (não digerido) em diferentes concentrações molares.

4.12.5. Preparação de bactérias competentes para serem usadas na clonagem do gene *LaRpa-1*

Uma colônia de bactéria *E. coli* DH5 α foi inoculada em 3 mL de meio LB líquido sem ampicilina (item 4.3.2) e a cultura foi incubada por 16 h a 37 °C sob agitação. No dia seguinte, inoculou-se 1 mL da cultura em 62,5 mL de meio LB líquido sem ampicilina (item 4.3.2), seguindo-se incubação a 37 °C sob agitação até a cultura atingir um valor de absorbância (DO_{550}) de 0,6. Em seguida, o frasco com a cultura foi colocado por 1 h em gelo e as células foram coletadas por centrifugação a 1780,93 g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e as bactérias foram então ressuspensas cuidadosamente em 21 mL de meio FB (item 4.3.2),

incubadas no gelo por 1 h e centrifugadas a 1780,93 g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado, as bactérias foram então ressuspensas cuidadosamente em 5 mL de meio FB (item 4.3.2), distribuídas em alíquotas de 100 µL em tubos de 500 µL autoclavados e estocadas a -70 °C.

4.12.6. Clonagem em vetor de clonagem TOPO dos fragmentos de DNA amplificados por PCR contendo a sequência total e parcial do gene *LaRpa-1*

Os fragmentos de DNA purificados em gel resultantes da amplificação por PCR da sequência do gene *LaRpa-1* foram clonados no vetor TOPO utilizando-se o kit de clonagem "TOPO TA Cloning – pCR 2.1 TOPO" (item 4.1). Para tal, utilizou-se uma proporção inserto:vetor de 3:1, segundo as recomendações do fabricante (Invitrogen). Posteriormente, 100 µL de bactérias *E. coli* DH5α competentes foram transformadas com 5 µL da mistura de ligação, por choque térmico (2 min a 42 °C), adicionou-se meio SOC (item 4.3.2), seguido de incubação por 1 h a 37 °C sob agitação e plaqueamento em placas de 20 mL com meio LB sólido com ampicilina (item 4.3.2) na presença de 0,04 mg/mL de X-Gal e 0,28 mM de IPTG. As placas foram incubadas por 16 h a 37 °C. Clones recombinantes de duas transformações (ligação TOPO TA com produto de PCR amplificado a partir de DNA genômico e ligação TOPO TA com produto de PCR amplificado a partir de cDNA) foram inoculadas em 3 mL de meio LB líquido com ampicilina (item 4.3.2) e incubadas por 16 h a 37 °C para a extração do DNA dos plasmídeos recombinantes.

4.12.7. Mini-preparações do DNA de plasmídeo recombinante

Foram realizadas mini-preparações do DNA de plasmídeo recombinante utilizando-se o kit "Perfectprep® Plasmid Mini" (item 4.1), seguindo as recomendações do fabricante (Eppendorf).

4.12.8. Obtenção da sequência do gene *LaRpa-1*

Os três fragmentos amplificados por PCR (fragmento contendo a sequência parcial interna do gene *LaRpa-1*, fragmentos contendo a sequência total do gene *LaRpa-1* obtidos da amplificação a partir de DNA genômico e de cDNA dupla fita) foram sequenciados utilizando-se os mesmos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para a amplificação por PCR (Figura 18 e item 4.4.2). Os DNAs extraídos de plasmídeos recombinantes foram sequenciados utilizando-se os iniciadores presentes no sítio de clonagem do vetor: M13 senso e M13 antisense (item 4.4.3) e os iniciadores utilizados para amplificação por PCR (Figura 18 e item 4.4.2).

Para as reações de sequenciamento foi utilizado o kit "Big Dye Terminator" versão 3.0 (item 4.1) conforme recomendado pelo fabricante (Applied Biosystems), e os DNAs obtidos da amplificação por PCR assim como os extraídos de plasmídeos recombinantes foram sequenciados no sequenciador ABI 377 (item 4.6) no laboratório de Biofísica Molecular no LNLS pela técnica Luciana Camillo (colaboração com o Professor Dr. Carlos Henrique I. Ramos). As sequências foram analisadas utilizando-se os programas **Blast2** e **Blastp** (www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST) para o alinhamento de duas sequências e para a análise da identidade e similaridade com sequências preditas de aminoácidos que se encontram nos bancos de dados de proteínas, respectivamente, **Clustal W** (www.ebi.ac.uk/clustalw/) para o alinhamento de múltiplas sequências e **Gene Runner** (www.generunner.com) para a tradução da sequência putativa do gene *LaRpa-1*.

4.13. CARACTERIZAÇÃO DO GENE *LaRpa-1*

4.13.1. Mapeamento do gene *LaRpa-1* em cromossomos de *L. (L.) amazonensis* separados por PFGE

4.13.1.1. Preparação das amostras de DNA cromossômico de *L. (L.) amazonensis*

O DNA cromossômico foi preparado a partir de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* segundo descrito por Wincker e col. [40] e modificado por Conte e Cano (manuscrito em

preparação). Foram preparados blocos com agarose de baixo ponto de fusão contendo 5×10^7 parasitas, e posteriormente digeridos por 24 h em tampão de lise (item 4.2).

4.13.1.2. Separação dos cromossomos de *L. (L.) amazonensis* por eletroforese de campo pulsado ("Pulsed Field Gel Electrophoresis": PFGE)

A separação dos cromossomos por PFGE foi realizado pelo aluno de mestrado Fábio F. Conte. Os cromossomos foram separados em gel de agarose para PFGE 1,1% (p/v) em 0,5X TBE (item 4.2) a 4 °C utilizando-se o aparelho "Gene Navigator" (item 4.6). As condições de corrida foram as seguintes: 50 s por 24 h, 100 s por 36 h, 200 s por 36 h e 400 s por 24 h, a 100 V. Os marcadores utilizados foram os cromossomos de *S. cerevisiae* e *Hansenula wingei*. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografado sob luz UV usando-se fotodocumentador (item 4.6).

4.13.1.3. "Southern blotting" dos cromossomos ("chromo-blotting")

O DNA cromossômico foi transferido para membrana de náilon Hybond N+ utilizando-se o seguinte protocolo para transferência alcalina descrito por Sambrook e col. [171]: o gel foi lavado com H₂O destilada, colocado em uma vasilha contendo uma solução de 0,25 M HCl e incubado sob agitação suave por 30 min a t.a. Posteriormente, foi lavado com H₂O destilada e colocado em uma solução para transferência alcalina (item 4.2) sob agitação suave por 15 min a t.a., a solução era trocada e o gel novamente incubado sob agitação suave por 20 min a t.a. nessa solução. A transferência foi realizada por 48 h a t.a. na solução para transferência alcalina e a seguir a membrana foi neutralizada com solução neutralizante para transferência alcalina (item 4.2) e seca rapidamente sobre um papel de filtro a t.a. Os fragmentos de DNA transferidos para a membrana foram covalentemente ligados à mesma por "cross-linking" com luz UV por 2 min a 120000 J usando aparelho "UV cross-linker" (item 4.6).

Para realizar o mapeamento do gene *LaRpa-I*, os "chromo-blots" foram hibridizados com o fragmento interno do gene obtido por amplificação por PCR (0,741 Kb) marcado radioativamente por "random primer extension" (item 4.10.1). O DNA cromossômico foi incubado com solução de pré-hibridização (item 4.2) durante 1 h a 65 °C, seguindo-se a

hibridização com a sonda marcada radioativamente por 16 h a 65 °C. Foram feitas duas lavagens da membrana com solução 1 (item 4.2) por 5 min a t.a., uma lavagem com solução 2 (item 4.2) por 15 min a t.a. e uma nova lavagem em solução 2 por 5 min a 55 °C. As membranas foram expostas em filme X-Omat por 16 h a -80 °C.

4.13.2. Análise da organização genômica do gene *LaRpa-1*

4.13.2.1. Digestão do DNA genômico de *L. (L.) amazonensis*

Para dar início a esse estudo, efetuou-se a análise de restrição da sequência nucleotídica do gene *LaRpa-1* utilizando-se o programa Gene Runner. Essa análise forneceu dados sobre o número e posição dos sítios para enzimas de restrição encontrados ou não dentro da sequência do gene. Para a digestão do DNA genômico foram usadas enzimas de restrição que estão presentes no mapa de restrição do gene *LaRpa-1* (*Ava*II, *Not*I, *Sal*I, *Afa*I, *Mbo*I), e enzimas que não estão presentes no mesmo (*Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III). O DNA genômico (10 µg) dos parasitas foi digerido com 20 U das enzimas de restrição já mencionadas acima, de acordo com as recomendações do fabricante (Amersham Biosciences).

4.13.2.2. "Southern Blotting" do DNA genômico de *L. (L.) amazonensis*

Os fragmentos resultantes da digestão do DNA genômico foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) em 0,5X TAE (item 4.2), corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografados sob luz UV usando-se fotodocumentador (item 4.6). Posteriormente, o DNA foi desnaturado sob agitação suave por 1 h a t.a., utilizando-se solução de desnaturação (item 4.2), neutralizado sob agitação suave por 1 h a t.a., utilizando-se solução de neutralização (item 4.2) e transferido por capilaridade para membrana de náilon Hybond N+ por 16 h a t.a., utilizando-se 20X SSC (item 4.2). Os fragmentos de DNA transferidos para a membrana foram covalentemente ligados à mesma por "cross-linking" com luz UV por 2 min a 120000 J utilizando-se aparelho cross-linker (item 4.6). O "Southern Blotting" foi realizado hibridizando-se os fragmentos de DNA contidos na membrana, com o fragmento interno do gene *LaRpa-1* (0,741 Kb) marcado radioativamente por "random primer extension" (item 4.10.1). Os

fragmentos de DNA transferidos para a membrana foram incubados em solução de pré-hibridização (item 4.2) por 1 h a 65 °C seguindo-se a hibridização com a sonda marcada radioativamente por 16 h a 65 °C. Foram feitas duas lavagens da membrana com solução 1 (item 4.2) por 5 min a t.a., seguidas de duas lavagens com solução 2 (item 4.2) por 10 min a 50 °C. A membrana foi exposta em filme X-Omat por 16 h a -80 °C. Utilizou-se marcador de tamanho molecular de DNA de 1 Kb.

5. RESULTADOS

5.1. MANUSCRITO PUBLICADO NO PERIÓDICO *EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY*: "Identification of the three proteins that associate *in vitro* with the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* G-rich telomeric strand".

Identification of three proteins that associate *in vitro* with the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* G-rich telomeric strand

Maribel F. Fernández¹, Rafael R. Castellari², Fábio F. Conte¹, Fábio C. Gozzo³, Adão A. Sabino³, Hildete Pinheiro⁴, José C. Novello², Marcos N. Eberlin³ and Maria I. N. Cano¹

¹Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas; ²Laboratório de Química de Proteínas (LAQUIP), Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia; ³Instituto de Química; ⁴Departamento de Estatística, Instituto de Matemática, Estatística e Computação Científica, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Brazil

The chromosomal ends of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* contain conserved 5'-TTAGGG-3' telomeric repeats. Protein complexes that associate *in vitro* with these DNA sequences, *Leishmania amazonensis* G-strand telomeric protein (LaGT1-3), were identified and characterized by electrophoretic mobility shift assays and UV cross-linking using protein fractions purified from S100 and nuclear extracts. The three complexes did not form (a) with double-stranded DNA and the C-rich telomeric strand, (b) in competition assays using specific telomeric DNA oligonucleotides, or (c) after pretreatment with proteinase K. LaGT1 was the most specific and did not bind a *Tetrahymena* telomeric sequence. All three LaGTs associated with an RNA sequence cognate to the telomeric G-rich strand and a complex similar to LaGT1 is formed with a double-stranded DNA bearing a 3' G-overhang tail. The protein components of LaGT2 and LaGT3 were purified by

affinity chromatography and identified, after renaturation, as ≈ 35 and ≈ 52 kDa bands, respectively. The ≤ 15 kDa protein component of LaGT1 was gel-purified as a UV cross-linked complex of ≈ 18 –20 kDa. Peptides generated from trypsin digestion of the affinity and gel-purified protein bands were analysed by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight and electrospray ionization tandem mass spectrometry. The fingerprint and amino acid sequence analysis showed that the protein components of LaGT2 and of LaGT3 were, respectively, similar to the kinetoplastid Rbp38p and to the putative subunit 1 of replication protein A of *Leishmania* spp., whereas the ≤ 15 kDa protein component of LaGT1 was probably a novel *Leishmania* protein.

Keywords: affinity purification; EMSA; *Leishmania amazonensis*; mass spectrometry; telomeric proteins.

In almost all eukaryotes, including the pathogenic protozoan *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, telomeres are nucleoprotein complexes formed by tandem repeats of conserved DNA sequences associated with proteins [1,2]. One of the telomere strands is G-rich and runs 5' $\rightarrow$ 3' towards the end of the chromosomes, where it forms a single-stranded protrusion or 3' G-overhang [3]. The G-rich strand is the substrate for telomerase and for other telomere binding proteins involved in telomere length regulation and maintenance [4,5]. The length of this G-rich telomere

extension appears to be cell cycle regulated in humans and yeast [6–8] and its loss leads to genome instability and chromosomal end fusion through the activation of DNA damage checkpoints [5,9].

Proteins associated with both double-stranded and G-rich single-stranded telomeric DNA and with accessory proteins have been described in many eukaryotes. These proteins form a high order nucleoprotein complex that functions mainly to maintain the genome stability by regulating telomerase activity, the expression of genes positioned at telomeres, and the capping of chromosome ends to protect them from degradation and fusions [10,11]. For example, during the S phase, which is the period of increased single-strand extension in yeast telomeres [7], Cdc13p exhibits high affinity for the G-strand. Cdc13p activity is essential for the protection of chromosome ends and also positively and negatively regulates the replication of telomeres [12–14]. The positive regulatory role involves the formation of a complex with the telomerase-associated protein Est1, resulting in the recruitment of telomerase to telomeres [15,16]. In addition, the interaction of Cdc13p with Stn1p and/or with Ten1p, might negatively regulate telomerase recruitment [17,18]. Cdc13p is also associated with DNA pol α [19], although the relevance of this association has only very recently been clarified. Chandra *et al.* [14] identified mutations of

Correspondence: M. I. N. Cano, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, Campinas, São Paulo, 13083-970, Brazil. Fax: /Tel.: + 55 19 37887370, E-mail: micano@unicamp.br

Abbreviations: LaGT, *Leishmania amazonensis* G-strand telomeric protein; Cdc13, cell division control protein 13; EMSA, electrophoretic mobility shift assays; Est1, ever short telomere 1; NP-40, Nonidet P-40; OB, oligonucleotide/oligosaccharide-binding; OnTebp, *Oxytricha nova* telomere binding protein; Pot1, protection of telomere 1; Rpa1, replication protein A subunit 1; Rbp38, RNA binding protein 38; Trf1 and Trf2, telomere repeat factor 1 and 2.

(Received 28 December 2003, revised 23 April 2004, accepted 1 June 2004)

CDC13 which led them to propose that the activities of Cdc13p actually correspond to distinct steps during telomere replication: one that coordinates and the other that regulates the synthesis of both telomere strands. In humans, hPot1 protein binds specifically to the G-rich telomere strand [20] and act as a telomerase-dependent positive regulator of telomere length [21]. Furthermore, it was shown recently that hPot1p interacts with the double-stranded telomeric protein Trf1 and this interaction increases the loading of hPot1p on the single-stranded telomeric DNA, which can provide a role for hPot1p in regulating telomere length [22].

Apart from telomerase activity [23] and the results described below, there are no descriptions of proteins that may interact specifically with *Leishmania* telomeres. Among the Kinetoplastida, a few reports have dealt with the telomeric chromatin of *Trypanosoma brucei* [24,25]. Eid and Sollner-Webb [26,27] described St1p and St2p, which are protein-DNA complexes with a high affinity for subtelomeric sequences of both procyclic and bloodstream forms of *T. brucei*. Three single-stranded protein-DNA complexes (C1, C2 and C3) specific for the G-rich telomeric repeat have been shown to copurify with telomerase activity in *T. brucei* [28]. Two of these complexes (C2 and C3) also bind to an RNA sequence cognate to the telomeric DNA and to a partial duplex that mimics 3' G-overhangs. Complex C3 also shares features with single-stranded telomeric G-rich proteins described in other eukaryotes [29], and the predictive sequence of C3-associated proteins shows that they are probably novel specific *T. brucei* single-stranded telomere-binding proteins. Other G-strand binding proteins of *Leptomonas* and *T. brucei* have been described but not characterized [30].

Here, we report the partial characterization and the identification of three *L. amazonensis* proteins that bind *in vitro* to the telomeric G-strand (*L. amazonensis* G-strand telomeric proteins; LaGT1, LaGT2 and LaGT3). Binding activities were found in S100 and nuclear extracts of *L. amazonensis* promastigotes after anion-exchange chromatography. Purification of the protein components of LaGT2 and LaGT3 was achieved using single-stranded 5'-biotinated G-telomeric oligonucleotide affinity columns. Two major proteins of approximately 35 kDa and 52 kDa were eluted from the columns and identified as components of LaGT2 and LaGT3, respectively, after renaturation experiments. LaGT1 protein (≤ 15 kDa) was gel-purified as a Coomassie-stained UV-irradiated complex of ≈ 18 –20 kDa that migrated in the same position of the radiolabeled LaGT1 UV-irradiated complex. MALDI-TOF MS fingerprint analysis and ESI-MS/MS sequencing of tryptic digested peptides indicated that the ≈ 52 kDa band with LaGT3 activity was similar to subunit 1 of the conserved single-stranded binding protein, replication protein A (Rpa1) of *Leishmania* spp., whereas the ≈ 35 kDa protein with LaGT2 activity was homologous to the RNA-binding protein characterized previously as Rpb38p in *Leishmania tarentolae* and *T. brucei* [31]. The protein component of LaGT1 (≤ 15 kDa) has no homologues in the protein databases indicating that it is probably a novel *Leishmania* protein. The telomere function of the LaGT protein components in *Leishmania* remains to be determined.

Materials and methods

Parasite cultures

Promastigote forms of *L. amazonensis*, strain MHOM/BR/73/M2269, were cultivated in Schneider's medium (Sigma) supplemented with 5% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (Cultilab) and 1 $\times$ antibiotic/antimycotic solution (Life Technologies) at 28 °C for 72 h in 25 cm³ culture flasks. Parasite cultures were maintained in exponential growth and monitored by counting in a hemocytometer.

L. amazonensis S100 and nuclear extracts

S100 extract was obtained in the presence of protease inhibitors as described by Cano *et al.* [23]. Nuclear extracts were prepared using a modification of the protocol reported by Noll *et al.* [32]. Parasite cells were harvested by centrifugation at 11 400 *g* for 15 min at 4 °C and washed in 1 $\times$ NaCl/P_i supplemented with 2% (v/v) glucose. The pellets were resuspended in buffer A (20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1 mM EGTA, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0, 1 mM spermidine, 0.3 M spermine, 5 mM 2-mercaptoethanol), supplemented with a cocktail of protease inhibitor (Set III, Calbiochem) and 0.5% (v/v) Nonidet P-40 (NP-40) at 4 °C. The lysis was checked by reverse phase optical microscopy and fluorescence microscopy after DAPI staining. Nuclei were separated from the cytoplasmic fraction by centrifugation at 11 000 *g* for 1 h at 4 °C. The pellet containing intact nuclei was washed twice in 1 $\times$ TMG [10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1.2 mM MgCl₂, 10% glycerol (v/v)] at 17 700 *g* for 30 min at 4 °C and resuspended in 1 $\times$ TMG supplemented with the protease inhibitor cocktail, 1 mM dithiothreitol and 1 mM EGTA, pH 8.0. The lysis was achieved by blending in a mixer in the presence of liquid nitrogen. The protein extract was separated from nuclear debris by centrifugation at 39 800 *g* for 20 min at 4 °C followed by ultracentrifugation at 100 000 *g* for 90 min at 4 °C. The supernatant (aqueous phase) was aliquoted and frozen in liquid nitrogen. The protein concentrations of the resulting S100 and nuclear extracts were determined by the Bradford method (Bio-Rad). For the binding assays, the extracts were fractionated by anion-exchange DEAE-agarose chromatography (Bio-Gel A, Bio-Rad). The columns were equilibrated with 1 $\times$ TMG containing 50 mM sodium acetate (NaOAc), pH 8.0, and washed with six volumes of 1 $\times$ TMG. The proteins were eluted with increasing concentrations of NaOAc, pH 8.0, in 1 $\times$ TMG. When appropriate, and before testing for binding activity, all fractions were desalted in Microcon-30 filters (Amicon) to a final salt concentration of 50 mM.

Preparation of single-stranded, partial duplex with 3' G-overhang and double-stranded oligomers

DNA oligonucleotides (Table 1) were purchased from MWG (<http://www.mwg-biotech.com>) and Operon Technologies (<http://www.qiagen.com>) and gel purified before and after 5' end-labeling with [³²P]ATP[γ P] and T₄ polynucleotide kinase [33]. The partial duplex 3' G-rich overhang and double-stranded telomeric DNA were obtained by mixing equimolar amounts of radiolabeled

Table 1. Oligonucleotides used in EMSA, UV cross-linking and in affinity chromatography.

Oligonucleotide	Sequence
Tel1	5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'
Tel2	5'-TAGGGTTAGGGTTAGGGT-3'
Tel3	5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTT-3'
Tel4	5'-GGGTTAGGGTTAGGGTTA-3'
Tel5	5'-GGTTAGGGTTAGGGTTAG-3'
Tel6	5'-GTTAGGGTTAGGGTTAGG-3'
Tel6-Rev	5'-CCTAACCCCTAACCTAAC-3'
Tel6RNA	5'-GUUAGGGUUAGGGUUAGG-3'
Tet-tel	5'-GTTGGGGTTGGGGTTGG-3'
T3	5'-AATTAACCTCACTAAAGGG-3'
T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGG-3'
TS	5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'
OvhF	5'-CTGGCCGTCGTTTCTACTTAGGGTTAGGGTTAGG-3'
OvhR	5'-GTAAACGACGGCCAG-3'
CSB1	5'-GTACAGTGTACAGTGTACAGT-3'
5' biotinTel6	5' biotin-GTAATACGACTCGTTAGGGTTAGGGTTAGG-3'

sense and antisense oligonucleotides, as described by Cano *et al.* [28]. Fully partial duplex and double-stranded DNA (dsDNA) were purified from the residual single-stranded DNA (ssDNA) and quantified [28].

Electrophoretic mobility shift assay

All the conditions used for the binding reactions and the EMSA, including temperature of binding and the concentration of protein fractions and oligoprobes were standardized prior to proceeding with the experiments. Due to the scarcity of telomeric proteins in semipurified S100 and nuclear extracts, the complexes (LaGT1, LaGT2 and LaGT3) were formed when a minimum of 1 µg of protein fractions and 9–25 fmol of labeled telomeric DNA oligoprobe were used in the binding reactions. In most of the assays shown here we used protein fractions (1 µg each) from the S100 and nuclear extracts that were semipurified in DEAE-agarose columns. They were incubated individually with 9 fmol of purified 5' [³²P]ATP[γP] end-labeled oligonucleotide in a 20 µL reaction containing 25 mM Hepes, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, pH 8.0, 100 mM KCl, 10% (v/v) glycerol, 0.1% (v/v) NP-40, 0.5 mM dithiothreitol and 100 ng of poly(dI-dC):poly(dI-dC) (Amersham Biosciences). Samples were incubated on ice for 30 min before loading onto a 6% native PAGE gel [37.5 : 1, acrylamide/bis-acrylamide (w/w)] in 0.5× TBE (44.5 mM Tris base, 44.5 mM boric acid, 1 mM EDTA, pH 8.0) at 4 °C followed by electrophoresis at 150 V for ≈ 3 h. For autoradiography, wet gels were exposed for 2 h to a Kodak X-Omat film at –80 °C.

Competition assays

For the binding assays, nonradiolabeled oligonucleotide competitors were added in excess relative to the amount of 5' [³²P]ATP[γP] end-labeled Tel6 oligoprobe (Table 1). The concentrations of competitors in these reactions were 0.45,

0.9, 2.25, 4.5, 9, 18 and 36 pmol. As the order of addition of the competitors relative to the probe did not affect the binding activity of the complexes tested (data not shown), the competition assays were done by adding the probe and competitor at the same time.

The shift in the protein·DNA complexes in the absence or presence of a molar excess of unlabeled competitors in two independent EMSA, was assessed quantitatively using SCION IMAGE processing and analysis software (<http://www.scioncorp.com>) as described in Cano *et al.* [28]. The results plotted in the graphs represent the percentage of the binding activity of a shifted complex (the ratio of the density area in arbitrary scanning units, and the sum of the density areas of all shifted complexes, including unbound oligonucleotide, in each lane, multiplied by 100). The statistical analysis of three independent results was performed using SAS software as described below.

Statistical analysis

The software used for the statistical analysis was sas (SAS Institute Inc., The SAS System for Windows, Release 8.02 TS Level 02M0, 2001; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). All the analysis used the Mantel–Haenszel test statistic to test the null hypothesis of equal distribution of the density areas of each complex in the absence or presence of salts and or unlabeled competitors. The null hypothesis was rejected for $P < 0.05$, compared to the control.

Proteinase K digestion

To ensure the complexes were formed by the association of proteins and nucleic acids, 1 µg of each protein fraction was treated with 10 µg of proteinase K (Amersham Biosciences) for 15 min at 56 °C before the binding assays.

Effect of salt concentration

Binding assays using the DEAE fractions of S100 and nuclear extracts were done in the presence of a standard concentration of KCl (100 mM) used in normal reactions and varying concentrations of MgCl₂ (0–50 mM), or of a standard concentration of MgCl₂ (5 mM) used in normal reactions and varying concentrations of KCl (0–800 mM).

UV cross-linking assays

UV cross-linking in solution was performed on ice by exposing the 20 µL binding reaction mixture in siliconized Eppendorf tubes covered with plastic film to 254 nm UV light (Ultra-lum, Inc., Claremont, CA, USA) for 15 min as described previously [28]. After irradiation, the samples were mixed with 5× SDS loading buffer to a final concentration of 1×, boiled for 5 min and loaded onto a 12% polyacrylamide gel [29 : 1, acrylamide/bis-acrylamide (w/w)]. Electrophoresis was carried out in 1× protein running buffer [33] at room temperature. The gel was fixed in 10% methanol/5% glacial acetic acid (v/v) for 30 min at room temperature and exposed for 1–18 h to a Kodak X-Omat film at –80 °C.

UV cross-linking *in situ* was also carried out by exposing a wet 6% mobility shift gel on ice to 254 nm UV light for

30 min; the gel was no more than 5–7 cm from the source. The gel was then exposed to film and the bands corresponding to each complex were excised, eluted overnight at 4 °C in 1× SDS loading buffer, denatured for 5 min and loaded onto a 12% gel. The gel was fixed and exposed for 1–18 h to a Kodak X-Omat film at –80 °C. In both cases, molecular mass markers (Rainbow, Amersham Biosciences) were included to identify the positions of the cross-linked proteins.

SDS/PAGE and Coomassie blue staining

Protein fractionation was done in 12% and 15% gels [29 : 1, acrylamide/bis-acrylamide (v/v)] and electrophoresis was carried out in 1× protein running buffer at room temperature. The protein bands were visualized by Coomassie blue staining, according to a standard protocol [33].

Purification of LaGT2 and LaGT3 activities by G-DNA affinity chromatography

The purification step using anion-exchange chromatography was done at 4 °C [28]. DEAE-agarose fractions (2.98 mg of protein corresponding to $\approx 2.8 \times 10^9$ cells) from S100 extracts containing the activities of all three LaGTs were affinity purified on separate G-DNA columns (0.5 mL each) prepared with modifications of the protocol described by Schnapp *et al.* [34]. For preparation of the column, 1 mL of 50% (v/v) Ultralink Immobilized NeutravidinTM Plus (Pierce) was pre-equilibrated in buffer E (100 mM KCl, 0.1% (v/v) NP-40, 25 mM Hepes, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, pH 8.0, 10% (v/v) glycerol, 0.5 mM dithiothreitol) for 15 min at 4 °C. Pools of three DEAE fractions (≈ 2.98 mg of protein) enriched for LaGT2 and LaGT3 activities (75 mM, 100 mM and 200 mM) were then mixed with 4 nmol of 5'-biotin-Tel6 oligonucleotide (Table 1) in the presence of buffer E and 10 µg of poly(dI-dC)-poly(dI-dC) for 30 min at 4 °C. These oligonucleotide/extract mixtures were added to 500 µL of pre-equilibrated NeutravidinTM beads and incubated overnight at 4 °C. The mixtures were then poured and packed into a 2 mL disposable column (Bio-Rad) and the unbound proteins were collected in the column flow-through. The column was washed with 10 column volumes of buffer E and the bound proteins were eluted with a stepwise KCl gradient (0.6–2.2 M) in buffer E. Five 1.0 mL fractions were collected, concentrated, desalted in Microcon-30 filters, and tested for LaGT activities in UV cross-linking assays. As a control, mock columns were prepared in the absence of 5'-biotinylated oligonucleotide.

Purification of LaGT1 activity

The protocol used to purify the LaGT1 protein component was a modification of the method described for the purification of *T. brucei* telomeric complex C3 [28]. DEAE fractions from S100 extract enriched for LaGT1 protein were pooled (10 mg) and mixed with 5.0 nmol of unlabeled Tel6 in a preparative binding reaction as described above. As a control, a 20 µL binding reaction was carried out with the pool of the DEAE fractions and a 5' end-labeled Tel6 oligonucleotide (see above). Both binding reactions were

fractionated in the same 6% native polyacrylamide gel, and after running, the complexes were UV cross-linked *in situ* (see above). The gel was then exposed to film to reveal the position of the labeled LaGT1 complex. The labeled and unlabeled complexes were excised from the gel based on the position of the labeled complex and eluted overnight with gentle agitation at 4 °C in 1× protein-loading buffer. The protein-forming LaGT1 complexes were separated by SDS/PAGE in a 15% gel, Coomassie-stained and exposed to Kodak X-Omat film. The unlabeled protein band was further digested with trypsin and submitted to MS analysis (see below).

Peptide mapping and sequencing by mass spectrometry (MALDI-TOF MS and ESI-MS/MS)

Coomassie-stained protein bands containing LaGT2 and LaGT3 activities and the irradiated protein-DNA LaGT1 complex were excised from the gel, in-gel digested with trypsin (sequencing grade porcine trypsin, Promega), according to the University of California, San Francisco (UCSF) Mass Spectrometry Facility in-gel digestion procedure (<http://donatello.ucsf.edu/ingel.html>), and subjected to MALDI-TOF MS, using a Voyager-DE PRO mass spectrometer (PerSeptive Biosystems) and a MALDI LR instrument (Micromass). To determine the molecular masses of the predicted peptides, the MALDI-TOF MS fingerprints were compared with the protein sequence databases (NCBI Inr and Genpept) using the Protein Prospector MS-FIT 4.0 analysis program (P. R. Baker & K. R. Clauser; <http://prospector.ucsf.edu/ucshtml4.0/msfit.htm>) set at a mass tolerance (accuracy) of 50 p.p.m. and calibrated with protein standards (Sequazyme Peptide Mass Standards Kit, Calibration Mixture 1 and 2; Applied Biosystems). The searches were also performed manually using the *Leishmania* protein sequence database (*Leishmania* GeneDB, <http://www.ebi.ac.uk/parasites/leish.html>).

ESI-MS/MS analysis was performed in a Q-ToF (Micromass) coupled to a CapLC (Waters) chromatographic system. The tryptic peptides were purified using a Waters Opti-Pak C18 trap column. The trapped peptides were eluted using a water/acetonitrile 0.1% (v/v) formic acid gradient and separated by a 75 µm i.d. capillary column home-packed with C18 silica. Data was acquired in data dependent mode, and multiply charged ions were subjected to MS/MS experiments. The MS/MS spectra were processed using MAXENT3 (Micromass) and manually sequenced using the PEPSEQ program (Micromass).

Results

Three protein-DNA complexes interact *in vitro* with the G-rich telomeric strand of promastigotes of *L. amazonensis*

In addition to telomerase activity (data not shown), three protein-DNA complexes that interact *in vitro* with the G-rich telomeric strand were identified in DEAE-agarose fractions of S100 and nuclear extracts from *L. amazonensis* promastigotes. Due to the limiting amount of telomeric proteins present in these extracts, binding reactions were done with a minimum of 1 µg of the semipurified fractions

of S100 and nuclear extracts and varying concentrations of the telomeric DNA oligoprobe (data not shown). Three complexes named LaGT1, LaGT2 and LaGT3, according to their electrophoretic mobility in a 6% nondenaturing gel, were formed with different protein fractions of the S100 and nuclear extracts and the 5' end-labeled Tel6 oligonucleotide, and detected at 4 °C by EMSA. Using DEAE-agarose fractions from the S100 extract, complex LaGT1, the fastest migrating complex, was formed with fractions that eluted with 75–800 mM sodium acetate (Fig. 1A, lanes 3–10), although it was more abundant in fractions eluted with 100–400 mM sodium acetate (Fig. 1A, lanes 4–7). Complex LaGT2 was formed mainly with fractions eluted with

75–100 mM sodium acetate (Fig. 1A, lanes 3 and 4) and complex LaGT3 (the slowest migrating complex) was formed only with the fraction eluted with 75 mM sodium acetate (Fig. 1A, lane 3). All three complexes were formed when nonpurified S100 extract was used as the protein source in the binding reactions (Fig. 1A, lane 2) and no LaGT1 was formed when the reaction was incubated at temperatures above 4 °C (data not shown), suggesting that *in vitro* it is labile or unstable.

The same three complexes were formed when the DEAE-agarose fractions from nuclear extracts were used for the binding reactions with Tel6 as the oligoprobe. However, there were differences in the concentration and the elution

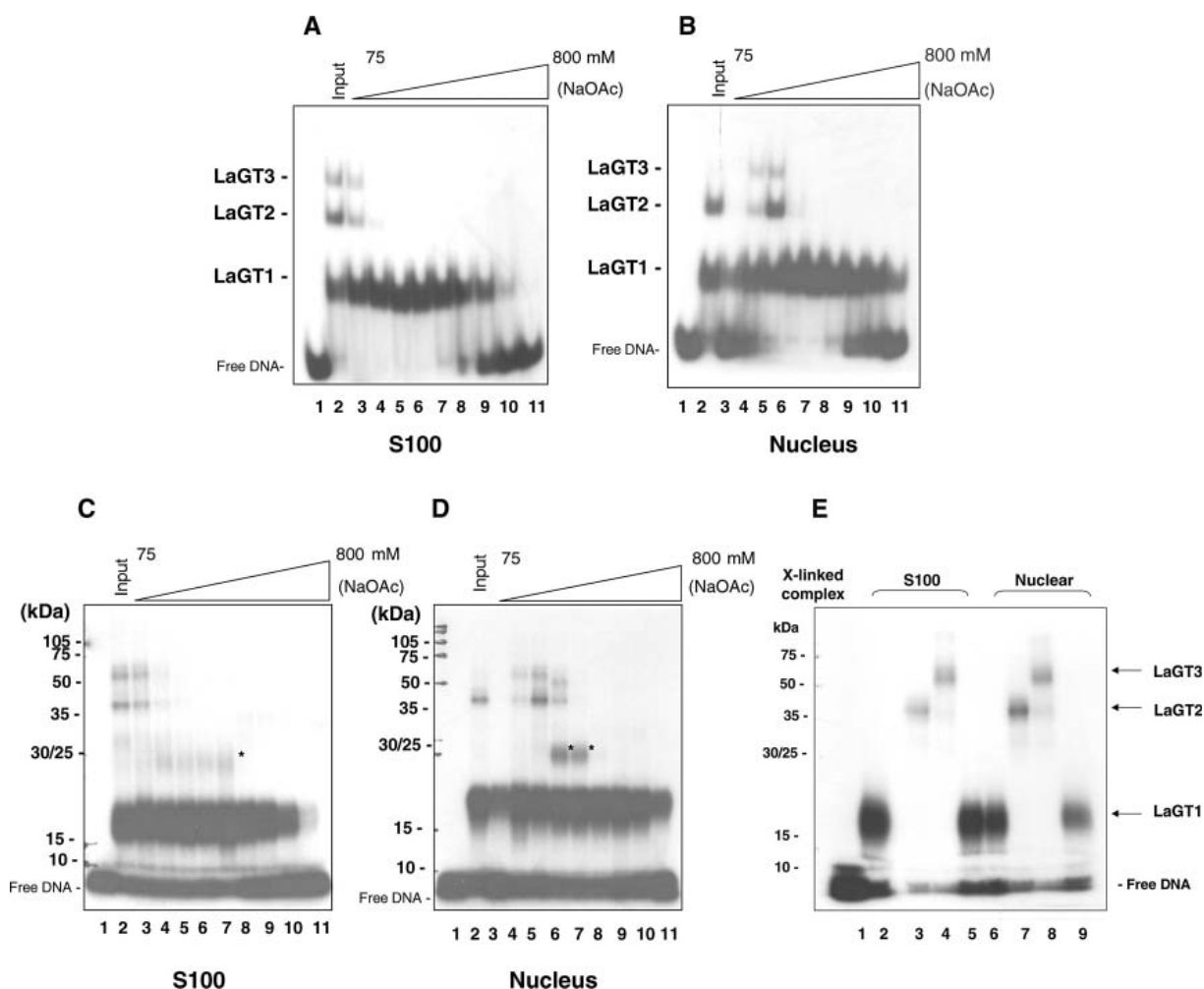


Fig. 1. The protein-DNA complexes that associate *in vitro* with the G-rich telomeric strand of *L. amazonensis*. Assays were carried out with the 5' end-labeled Tel6 as probe and crude extracts (input) or DEAE fractions eluted with sodium acetate (NaOAc). (A) EMSA of S100 extract (lane 2) and DEAE fractions (lanes 3–11). The shifted bands (LaGT1, LaGT2 and LaGT3) were classified according to their order of migration in the gel. (B) EMSA of nuclear extract (lane 2) and DEAE fractions (lanes 3–11). The shifted complexes were classified as in (A). In lanes 1 of (A–E), the reactions were carried out without extract. (C, D) Binding reactions in (A, B), respectively, were exposed to UV light and the cross-linked proteins then separated by SDS/PAGE in 12% gels (lanes 2–11 in both panels). The arrows (E) indicate the position of the cross-linked complexes. An extra ≈ 24 kDa complex, indicated with an asterisk, appeared only after exposing the binding reactions with S100 DEAE fractions 100–400 mM (lanes 4–7) and nuclear DEAE fractions 300–400 mM (lanes 6 and 7) to UV light. kDa, molecular mass in kilodaltons. (E) UV cross-linking *in situ* with proteins from S100 and nuclear extracts. The bands corresponding to LaGT UV-irradiated complexes that were eluted from the gel matrix and separated in 12% protein gels. For this assay the 75 mM (lanes 2, 3 and 4) and 400 mM (lane 5) DEAE fractions from S100 and the 200 mM (lanes 6, 7 and 8) and 500 mM (lane 9) DEAE fractions from the nuclear extract were used. The positions indicated on the right refer to the UV cross-linked complexes LaGT1, LaGT2 and LaGT3.

profile of some of the protein-forming complexes (Fig. 1B). LaGT1 was the most abundant and formed with all DEAE-agarose fractions eluted with 75–800 mM sodium acetate (Fig. 1B, lanes 3–11), but appeared in high concentration at 300–500 mM sodium acetate fractions (Fig. 1B, lanes 6–8). LaGT2 was formed with fractions eluting at 100–300 mM sodium acetate (Fig. 1B, lanes 4–6), and particularly with fraction 200 mM sodium acetate (Fig. 1B, lane 5). In contrast, LaGT3 was formed only with 100 mM and 200 mM sodium acetate fractions (Fig. 1B, lanes 4 and 5) and it was not visible when the reactions were carried out with nonpurified nuclear extract, probably because of its low concentration (Fig. 1B, lane 2). None of the complexes were formed when S100 and nuclear extracts were pretreated with 10 µg of proteinase K, indicating that they are indeed formed by the interaction of proteins and DNA (data not shown).

UV cross-linking assays were carried out to estimate the size of the proteins responsible for the LaGT1, LaGT2 and LaGT3 activities in both extracts (Fig. 1C,D). For these experiments, the same DEAE-agarose fractions that were used in the binding assays and Tel6 5' end-labeled assays were used. The irradiated samples were denatured at 95 °C in 1× SDS loading buffer and separated by SDS/PAGE in 12% gels. The gel in Fig. 1C shows four prominent bands of ≈ 18–20 to ≥ 60 kDa formed with the S100 (Fig. 1C, lanes 2–4) and nuclear (Fig. 1D, lanes 2 and 4–6) fractions. All molecular masses included the 18 mer (≈ 5.6 kDa) Tel6 oligonucleotide. The differences in the profile and size of the protein bands between the nonpurified extracts (Fig. 1C,D, lane 2) and the DEAE-agarose fractions may reflect the absence or presence of a specific protein which is able to bind to and cross-link with the Tel6 oligonucleotide.

UV-exposed samples containing the protein extracts and the oligoprobe showed 40–60 kDa bands formed with the fractions 75–100 mM (Fig. 1C, lanes 3 and 4) from S100 extract and fractions 100–300 mM (Fig. 1D, lanes 4–6) from nuclear extract, and ≈ 18–20 kDa band formed with the fractions 75–800 mM (Fig. 1C,D, lanes 3–11) from S100 and nuclear extracts, respectively. Proteins of approximately 24 kDa appeared cross-linked to Tel6 only after exposing the binding reactions to UV light (Fig. 1C, lanes 4–7 and Fig. 1D, lanes 6 and 7). Although this experiment alone was unable to accurately determine which protein bands were part of each individual complex, clearly bands of similar molecular mass were formed with purified and nonpurified S100 or nuclear extracts. UV cross-linking *in situ* was therefore carried out with DEAE fractions of S100 (75 mM and 400 mM) and nuclear (200 mM and 500 mM) extracts containing LaGT1, LaGT2 and LaGT3 activities. The complexes formed with the above fractions were cross-linked in the gel and the bands were then excised and eluted from the gel matrix. The eluted protein-forming complexes were fractionated by SDS/PAGE in 12% gels (Fig. 1E) and exposed to film for further identification. The bands corresponding to LaGT1 from the 75 mM and 400 mM fractions of S100 and 200 mM and 500 mM fractions from nuclear extracts were probably formed by ≈ 18–20 kDa complexed proteins as shown in Fig. 1E (lanes 2, 5, 6 and 9). The proteins that formed complexes LaGT2 and LaGT3 in the S100 (75 mM eluate) and nuclear (200 mM eluate) extracts migrated with molecular masses of approximately

40 kDa (Fig. 1E, lanes 3 and 7) and ≥ 60 kDa (Fig. 1E, lanes 4 and 8). In this experiment, the 'extra' ≈ 24 kDa protein band (Fig. 1C, lanes 4–7 and Fig. 1D, lanes 6 and 7) did not appear, probably because it was not part of any of the three LaGT complexes. The values estimated for the protein masses included the mass of the Tel6 oligonucleotide (≈ 5.6 kDa).

The binding specificity of LaGT protein-forming complexes was further tested with different oligoprobes. EMSA was performed using 5' end-labeled Tel1–Tel6 (3' end permutations of the telomeric sequence; Table 1), Tel6-RNA, a *Tetrahymena* telomeric sequence (Tet-tel) and Tel6-Rev (C-strand telomeric sequence) as single-stranded oligoprobes, together with a partial duplex DNA containing a 3' G-overhang and a double-stranded telomeric DNA (Materials and methods), using the 75 mM (enriched for LaGT2 and LaGT3 activities) and 400 mM (enriched for LaGT1 activity) DEAE fractions from the S100 extract. All three LaGT complexes were formed with Tel1–Tel6 and Tel6-RNA oligonucleotides. A corresponding complex, LaGT1, was also formed when the 3' G-overhang DNA construct was used as the oligoprobe. Although complexes similar to LaGT2 and LaGT3 were formed with the Tet-tel oligonucleotide, no complex was formed with double-stranded telomeric DNA and with the C-strand (Tel6-Rev), suggesting that all LaGT protein-forming complexes preferably associate to the G-rich *L. amazonensis* telomeric strand. These results are summarized in Table 2.

Salt stability of LaGT complexes

To further test the stability of all three protein-DNA complexes, binding reactions with the 75 mM and 400 mM fractions from S100 extract and with the 100 mM and 500 mM fractions from nuclear extracts and oligonucleotide Tel6 were carried out separately in the presence of increased salt concentration (MgCl₂ and KCl). In Fig. 2, the reactions

Table 2. Binding activity of LaGT protein-forming complexes with different oligoprobes. Signs – or + indicate the absence or presence of complex formation with the indicated oligoprobe, respectively. The sequence of each oligoprobe is given in Table 1. Details about the preparation of the partial duplex (with 3' G-overhang) and the double-stranded telomeric DNA are found in [29] and in Experimental procedures. EMSA was used to identify the binding activity of complexes formed with the oligoprobes. The protein source used for the LaGT1 binding assays were the 400 mM DEAE fraction of S100 extract. The protein source used for the LaGT2 and LaGT3 binding assays were the 75 mM DEAE fraction of S100 extract.

Oligoprobes	Binding activity		
	LaGT1	LaGT2	LaGT3
Tel1–Tel6	+	+	+
Tel6RNA	+	+	+
Tel6-Rev	–	–	–
Tet-tel	–	+	+
Partial duplex (with 3' G-overhang)	+	–	–
Double-stranded telomeric DNA	–	–	–

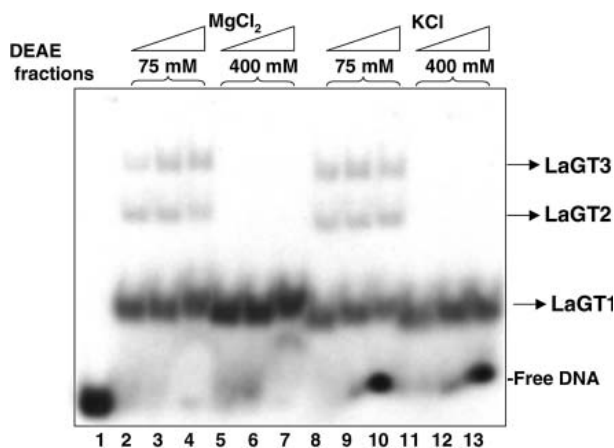


Fig. 2. High concentrations of $MgCl_2$ and KCl do not disturb the formation of the three LaGT complexes. EMSA was carried out with the 75 mM and 400 mM DEAE fractions of S100 extract and the 5' end-labeled Tel6 oligonucleotide. In lanes 2–7, the reactions were done in the presence of 100 mM KCl and 0 mM (lanes 2 and 5), 5 mM (lanes 3 and 6) and 50 mM (lanes 4 and 7) $MgCl_2$. In subsequent lanes, the reactions were performed in the presence of 5 mM $MgCl_2$ and 0 mM (lanes 8 and 11), 200 mM (lanes 9 and 12) and 800 mM (lanes 10 and 13) KCl . The reaction in lane 1 was carried out in the absence of extract.

were performed with 100 mM KCl (standard concentration used in normal reactions) and varying concentrations of $MgCl_2$ (0–50 mM) although other concentrations were also tested (eluate 75 mM in lanes 2–4, eluate 400 mM in lanes 5–7 and data not shown). The results suggest that regardless of the extract used, high concentrations of $MgCl_2$ did not disturb the binding activity of LaGT proteins. In contrast, binding assays done with 5 mM $MgCl_2$ (standard concentration used in normal reactions) and increased concentrations of KCl (0, 200 mM and 800 mM and others not shown) showed that depending on the extract used, LaGT1–3 activities were partially inhibited (Fig. 2, lanes 10 and 13). Similar results were obtained with the 100 and 500 mM fractions of nuclear extract (data not shown). These results show that the complexes are only slightly unstable in the presence of high concentrations of KCl . This suggests that, under our experimental conditions, the affinity of the proteins to the telomeric sequence may be in part dependent on electrostatic interactions.

LaGT1 is the most abundant and specific G-rich telomeric complex of *L. amazonensis*

The DNA binding specificity of LaGT1, LaGT2 and LaGT3 was also studied by competition assays using the same DEAE fractions (S100 and nuclear extracts) as above. Competition assays were standardized with unlabeled nonspecific oligonucleotides titrated alongside the same amounts of unlabeled telomeric oligonucleotides (in molar excess in relation to the oligoprobe) in the presence of protein extracts and Tel1–Tel6 as the oligoprobes (data not shown). The binding reactions shown in Fig. 3A were carried out with 1 μ g of extract and unlabeled telomeric oligonucleotides as specific competitors and in Fig. 3B,C

the reactions were done with 1 μ g of extract and unlabeled nontelomeric oligonucleotides (Table 1) as nonspecific competitors. The concentration of competitors used in these assays varied from 0.45 to 18 pmol, whereas the probe (labeled Tel6) was used in a fixed concentration of 9 fmol. Figure 3A shows a competition assay in which the 75 mM and 400 mM fractions from S100 (1 μ g) were incubated with labeled Tel6 (9 fmol) and increasing concentrations of unlabeled Tel6 as the specific competitor. In assays with the 75 mM fraction 0.45–18 pmol of competitor was used, and in those with the 400 mM fraction 0.9–36 pmol of competitor was used. In lane 1, the reaction was done in the absence of proteins. In subsequent lanes, the reactions were done with 75 mM fraction as the protein source and in the presence of increasing concentration of competitor. All three complexes were completely inhibited [0% binding activity; Fig. 3C, bottom] by concentrations of unlabeled Tel6 above 9 pmol. Because the LaGT1 activity in the 400 mM fraction was very high, the competition reactions with unlabeled Tel6 were done with 0.9–36 pmol of competitor (Fig. 3A, lanes 9–15). Quantitative analysis of this experiment (Fig. 3A, bottom) showed that LaGT1 activity was almost totally inhibited (96%) only in the presence of 36 pmol of specific competitor. These reactions were also done with the DEAE fractions of nuclear extract with similar results (data not shown).

In Fig. 3B, curves of titration (0.45–9 pmol) by the nonspecific competitors T3, T7 and TS are shown. Binding reactions were done with the 75 mM DEAE fraction from S100 extract as the protein source for all three LaGT activities and labeled Tel6 as probes. The results demonstrate that LaGT2 and LaGT3 binding activities were diminished by 50–80% in the presence of 0.9 pmol of the nonspecific competitors T3, T7 and TS whereas, high concentration of competitors (2.25–9 pmol) increased LaGT1 formation by $\approx$ 5–23%.

Figure 3C shows assays done with a fixed concentration (9 pmol) of each of the following nonspecific competitors: T3 (Fig. 3C, lanes 3 and 9), T7 (Fig. 3C, lanes 4 and 10), TS (Fig. 3C, lanes 5 and 11), Ovhr (Fig. 3C, lanes 6 and 12) and CSB1 (Fig. 3C, lanes 7 and 13), although other concentrations of these competitors were also tested (Fig. 3B and data not shown). The graph at the bottom of the figure shows that regardless of the protein source used in the assays, LaGT1 activity was not inhibited by any of these nonspecific competitors. In contrast, and as shown in Fig. 3B, increased LaGT1 activity (5–40%) was detected when the assays were done with the 75 mM fraction and the oligonucleotide competitors T3, T7, TS, Ovhr and CSB1 (Fig. 3C, lanes 3–7), whereas LaGT2 was inhibited 100% by oligonucleotide T3, and the presence of T7 diminished LaGT3 activity by 99% (Fig. 3C, lanes 3 and 4). LaGT2 activity was also diminished by 51–99% when the competitors used were T7, TS, Ovhr and CSB1 (Fig. 3C, lanes 4–7). LaGT3 activity decreased by 87–98% in the presence of unlabeled competitors T3, TS, Ovhr and CSB1 (Fig. 3C, lanes 3 and 5–7, respectively). In this case, and as shown in Fig. 3B, the increase in LaGT1 activity probably occurred in detriment to the other complexes, suggesting that more probe became available for LaGT1 binding or that low levels of quadruplex formation in the probes could have changed the effective concentration of the DNA present,

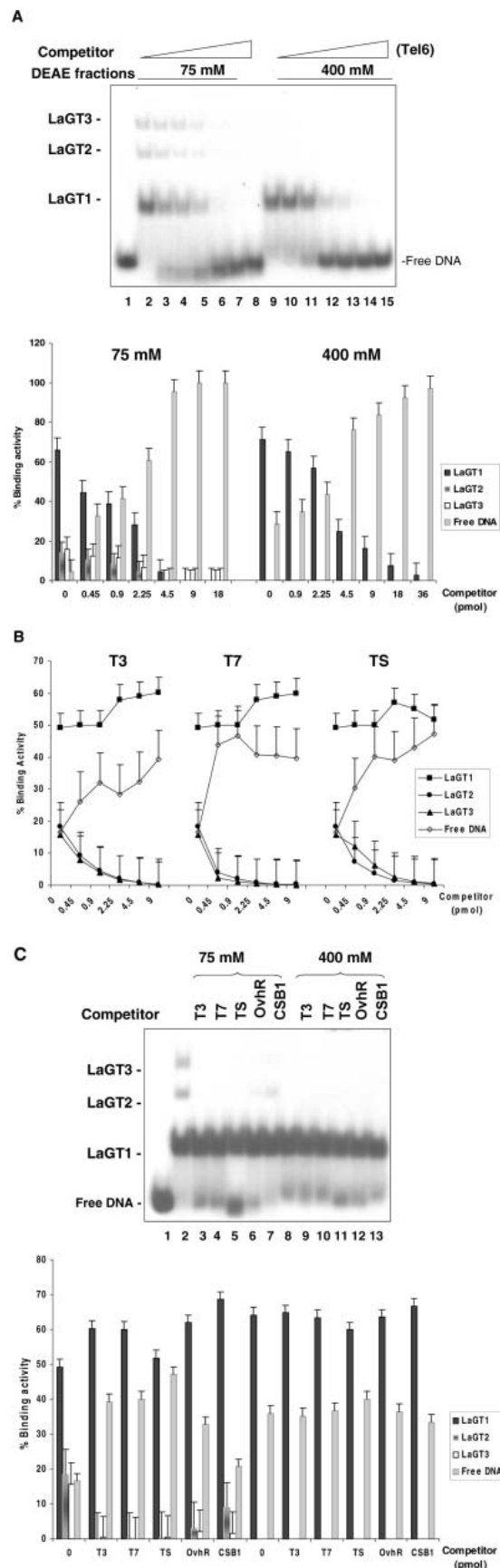
which could be subtle and variable for different competing sequences.

Assays performed with the 400 mM fraction of S100 (Fig. 3C, lanes 8–13 and data not shown) and with a 500 mM fraction of nuclear extract (data not shown), both enriched in LaGT1 activity, showed that LaGT1 was not inhibited by most of the nontelomeric oligonucleotides and was only slightly inhibited ($\approx 6\%$) by the oligonucleotide TS used to detect telomerase activity in TRAP assays [35]. These results indicate that LaGT1 is highly specific for the G-telomeric strand of *L. amazonensis*.

Purification and mass spectrometric identification of the protein-forming LaGT complexes

All three LaGT activities identified in the DEAE-agarose protein fractions were further purified by affinity chromatography on an analytical scale. The 100 mM and 600 mM sodium acetate DEAE fractions from the S100 extract, enriched in LaGT2/LaGT3 and LaGT1 activities, respectively, were loaded in separate affinity columns using a Tel6 5'-biotinylated oligonucleotide with a spacer at the 5' position as ligand (Table 1). LaGT2 and LaGT3 activities were eluted from the affinity column at 4 °C with increased KCl concentrations (0.6–2.2 M) (Fig. 4A). Size estimation of the affinity-purified proteins was performed in Coomassie-stained gels (Fig. 4A, lanes 6–10). Lanes 2–5 of this gel show the proteins present in the S100 extract, the proteins recovered in DEAE column flow-through, the loaded DEAE fraction (pool of the DEAE fractions 75–200 mM NaOAc) and the proteins that did not associate with the telomeric oligonucleotide in the affinity column (flow-through). Two major protein bands of approximately

Fig. 3. LaGT1 is highly specific for the *L. amazonensis* G-rich telomeric strand. EMSA using the 75 mM (enriched for LaGT2 and LaGT3 activities) and 400 mM (enriched for LaGT1 activity) fractions from the S100 extract and oligonucleotide Tel6 as probe, under the same conditions as in Figs 1 and 2. (A, top) Unlabeled Tel6 used at concentrations: 0.45 (lane 3), 0.9 (lanes 4 and 10), 2.25 (lanes 5 and 11), 4.5 (lanes 6 and 12), 9 (lanes 7 and 13), 18 (lanes 8 and 14) and 36 pmol (lane 15). The reaction in lane 1, was performed without extract. In lanes 2 and 9 (control reactions), no competitor was added. (A, bottom) The amount of each complex formed in the presence of increased concentrations of unlabeled competitors was expressed as the percentage of binding activity. (B) Titration curves for nontelomeric oligonucleotides T3, T7 and TS in competition assays with labeled Tel6 as probe and the 75 mM DEAE fraction as the protein source. Unlabeled competitors were used at concentrations varying from 0 to 9 pmol. (C, top) Unlabeled nontelomeric oligonucleotides (9 pmol each), T3 (lanes 3 and 9), T7 (lanes 4 and 10), TS (lanes 5 and 11), OvhR (lanes 6 and 12) and CSB1 (lanes 7 and 13) were used as competitors under the same conditions as in (A). Lane 1, reaction performed in the absence of extract; lanes 2 and 8 (control reactions), no competitors were added to the reactions. (C, bottom) The amount of each complex formed in the presence of increased concentrations of unlabeled competitors was expressed as the percentage of binding activity. The graphs show average results of three independent experiments performed in triplicates. Error bars represent the standard error. $P < 0.05$ compared to reactions done in the absence of competitors (control reactions).



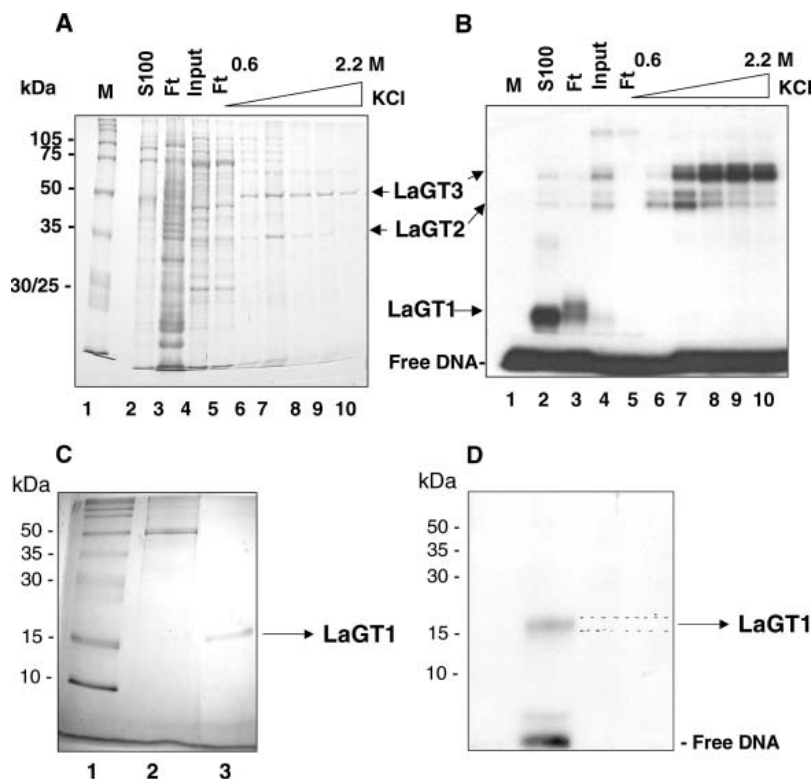


Fig. 4. Purification of LaGT activities. (A) Coomassie-stained SDS/PAGE (12% gel). In lane 1, molecular mass markers; lane 2, total S100 extract; lane 3, flow-through from DEAE-agarose column; lane 4, input (pool of DEAE fractions 75–200 mM); lane 5, flow-through from the affinity column; lanes 6–10, fractions eluted from the affinity column with increasing KCl concentration (0.6–2.2 M). (B) UV cross-linking assay of the protein fractions shown in A. Binding reactions were done with total S100 extract (lane 2), flow-through of DEAE column (lane 3), input (lane 4), flow-through of the affinity column (lane 5), affinity purified fractions (lanes 6–10), and the 5' end-labeled oligonucleotide Tel6. No extract was added to the assay in lane 1. (C) UV-irradiated LaGT1 complex was gel-purified and fractionated in a Coomassie-stained 15% protein gel. Lane 1, molecular mass marker; lane 2, irradiated LaGT1 complex formed with a labeled Tel6 oligonucleotide; lane 3, a Coomassie-stained ≈ 18 –20 kDa band corresponding to the unlabeled LaGT1 irradiated complex. (D) Autoradiogram of the gel in (C).

35 kDa and 52 kDa were eluted in all column fractions with a peak at 1 M KCl (Fig. 4A, lanes 6–10). Protein bands ≥ 65 kDa were also eluted with 0.6 M and 1 M KCl but did not have binding activity (Fig. 4A, lanes 6 and 7). UV cross-linking assays showed that all affinity-purified fractions had LaGT2 and LaGT3 activities with a peak in the 1 M KCl fraction (Fig. 4B, lanes 6–10) that correlated with the protein band patterns shown in Fig. 4A (compare corresponding lanes 6–10). A mock column, to which no biotinylated telomeric oligonucleotide was coupled, was used as a control. In this experiment, all proteins present in the loaded protein fraction were recovered in the column flow-through, indicating that the proteins eluted in the affinity columns associated specifically with the telomeric sequence (data not shown).

Various elution protocols were used to purify LaGT1 activity from affinity columns loaded with the 600 mM DEAE fraction without success (data not shown). LaGT1 remained associated with the telomeric oligonucleotide even at a high salt concentration, a pH gradient (pH 6.0–8.5) and temperatures above 25 °C (data not shown). We only succeed in the purification of LaGT1 after using a modification of the protocol described to purify the protein-forming *T. brucei* telomeric complex C3 [28] (Fig. 4D,E).

DEAE fractions enriched for LaGT1 activity were pooled and mixed with an unlabeled Tel6 (preparative reaction) and with a radiolabeled Tel6 oligonucleotide (control reaction), loaded in a preparative 6% native gel and *in situ* UV cross-linked. The irradiated complexes were eluted from the gel matrix and loaded onto a 15% protein gel. A major ≈ 18 –20 kDa Coomassie-stained band (Fig. 4D, lane 3) that migrated in the same position as the radiolabeled LaGT1 complex (Fig. 4E, lane 2) was detected.

The affinity purified protein bands of ≈ 35 kDa and ≈ 52 kDa and the UV-irradiated complex of ≈ 18 –20 kDa were in-gel digested with trypsin and subjected to MALDI-TOF MS and ESI-MS/MS analysis. The MALDI-TOF spectra obtained for the peptide mixtures produced by tryptic digestion of all proteins are shown in Fig. 5. Comparison of the predicted peptide mass using different databases showed that the ≈ 35 kDa protein shared high similarity with a hypothetical protein of *Leishmania major*, protein L3277.02 or LmRbp38 (Accession no. CAB71224) (the matched peptides cover 52% of the protein), that was identified as a homologue of *L. tarentolae* Rbp38p (Accession no. AAO39844). Rbp38p was recently described by Sbicego *et al.* [31] as an RNA-binding protein that stabilizes mitochondrial RNAs of kinetoplastid protozoa. The gene

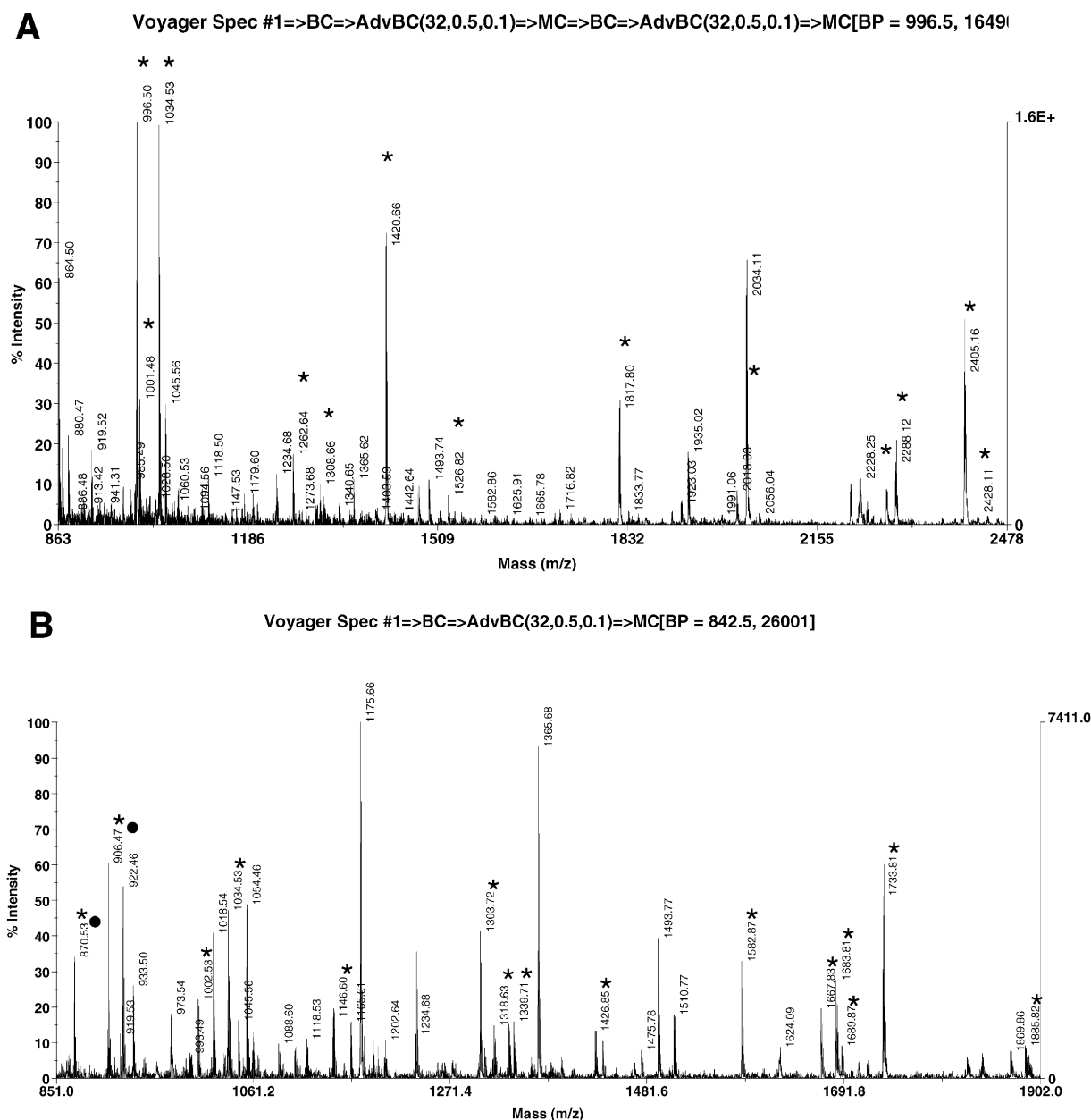


Fig. 5. MS fingerprint analysis of the affinity- and gel-purified protein bands containing LaGT activities. In (A) and (B), the peptides from ions are marked with an asterisk and the correspondent masses (m/z) were used in the database searches with Protein Prospector MS-FTT 4.0. The peptides from ions m/z marked with an asterisk can also correspond to trypsin autolysis products. (A) Mass spectrum of the tryptic peptides of the ≈ 35 kDa protein with LaGT2 activity. (B) Mass spectrum of the tryptic peptides of the ≈ 52 kDa protein with LaGT3 activity. (C) Mass spectrum of the LaGT1 UV-irradiated complex band (≈ 18 – 20 kDa). Peptide standards (Sequazyme Peptide Mass Standards kit, calibration mixture 1 and 2, Applied Biosystems) were used to calibrate the mass scale. (D) Mass spectrum of the unseparated peptide mixture of the LaGT1 UV cross-linked complex band obtained by ESI-MS/MS. The fingerprints shown in (A–C) were obtained by MALDI-TOF MS.

encoding Rbp38p is nuclear and shares high similarity ($\approx 72\%$) with *Tc38* (Accession no. AAQ63938.1), a *Trypanosoma cruzi* gene encoding a ssDNA binding protein [36]. The analysis of the predicted peptide mass from the ≈ 52 kDa protein showed that it was similar to the putative sequences of *Leishmania infantum* and *L. major* replication protein A subunit 1 (*LiRpa-1*, Accession no. AAK84867 and *LmRpa-1*, contig LmjF28-07-20031115_V2.0, respec-

tively) according to the searches in the protein databases (Genpept, NCBI and *Leishmania* GeneDB, <http://www.ebi.ac.uk/parasites/leish.html>) (the matched peptides cover 36.4% of the protein). Rpa-1 is a conserved single-stranded binding protein that plays a central role in DNA replication, recombination and repair [37] and is likely to be implicated with telomere maintenance [38]. The analysis of the MALDI-TOF MS spectrum of the trypsin digested LaGT1 UV

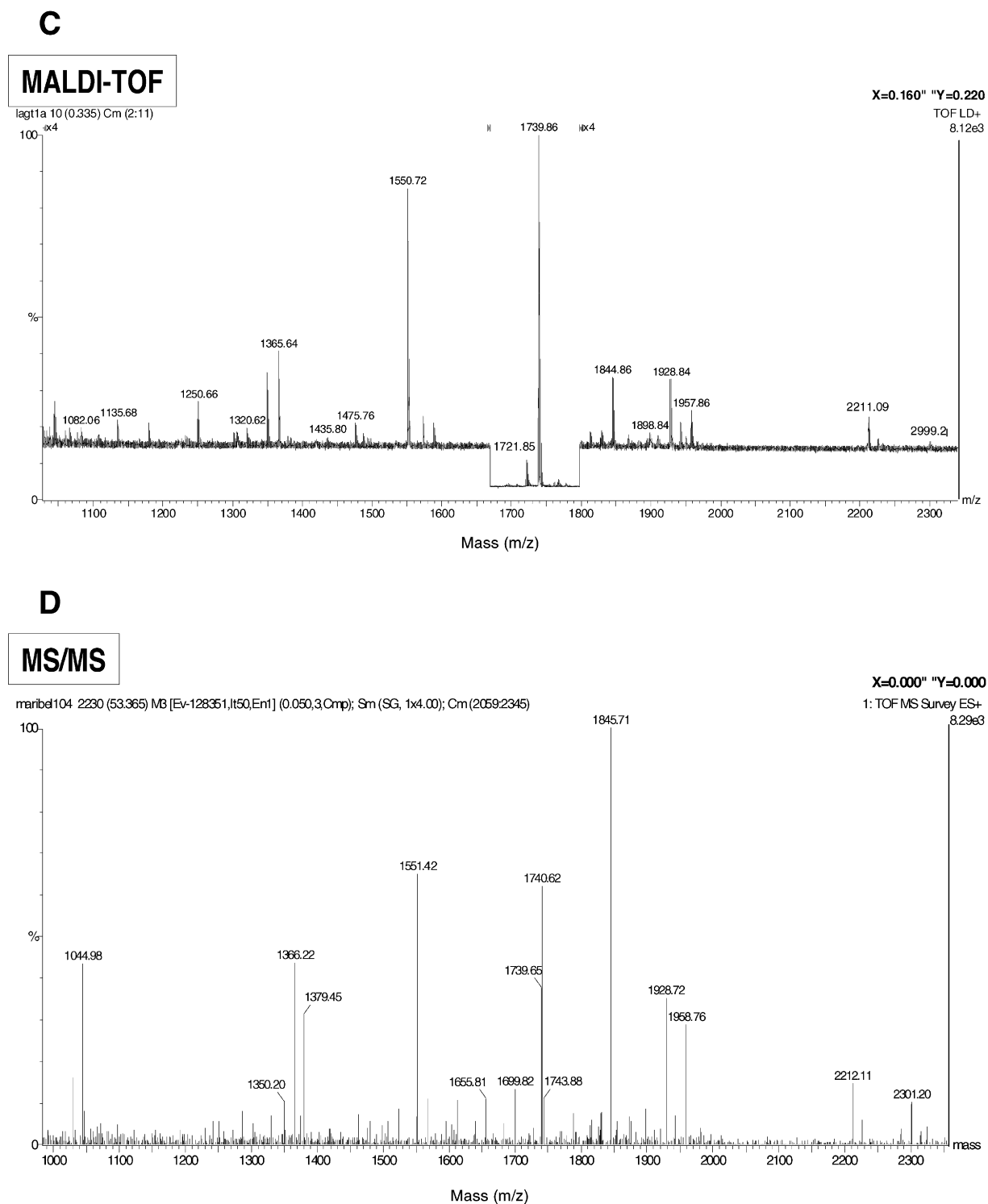


Fig. 5. (Continued).

cross-linked complex (Fig. 5C) shows that there are no homologues for the ≤ 15 kDa protein component in the databases searched, suggesting that it is likely to be a novel *L. amazonensis* protein.

The purification protocols described here permit us to isolate all protein-forming LaGT complexes with a high degree of purity (Table 3, Fig. 4D,E), allowing us to obtain

internal peptide sequences of the trypsin digested protein bands using ESI-MS/MS. The sequence tags generated from ESI-MS/MS *de novo* sequencing of LaGT2 and LaGT3 peptides shown in Table 4 corroborate the peptide mass fingerprint identification. However, it was not possible to sequence LaGT1 tryptic peptides, although the analysis of MS/MS mass spectrum of its unseparated peptide

Table 3. Purification scheme for LaGT2 and LaGT3 protein-forming complexes. Specific activity, % binding activity was calculated for 1 µg of protein. The fold purification was calculated based on the specific activity of the fractions assayed after each purification step relative to the S100 extract.

Protein fraction (step)	Fraction volume (mL)	Concentration (µg·µL ⁻¹)	Total protein (mg)	Specific activity (% binding·µg protein ⁻¹)		Purification factor (fold)	
				LaGT2	LaGT3	LaGT2	LaGT3
Whole cell extract (S100)	17.50	2.95	51.62	0.58	0.55	1.00	1.00
Ion exchange chromatography DEAE-agarose (75–200 mM sodium acetate)	1.27	2.35	2.98	6.02	8.37	10.38	15.22
Afinity chromatography (0.6–2.2 M KCl)	0.98	0.16	0.16	26.06	41.80	44.93	76.00

mixture, performed by MAXENT3, undoubtedly confirmed the results of the MALDI-TOF peptide mass fingerprint (compare the MS spectra in Fig. 5C,D).

We are currently trying to identify the LaGT1 protein component and clone the genes encoding LaGT2 and LaGT3 proteins for further functional analysis.

Discussion

In most organisms, including yeast, humans and the protozoa parasite *Leishmania* spp., the telomeric DNA is double-stranded but the 3' ends are single-stranded and G-rich [1,3,6,39]. This G-rich strand is critical because it is the substrate for telomere replication by telomerase and for the association of proteins that are responsible for chromosome end capping and thus, for regulating telomere length and genome stability [5,11].

Three protein:DNA complexes that associate *in vitro* with the *L. amazonensis* G-rich telomeric strand (LaGT1, LaGT2 and LaGT3) were identified in DEAE column fractions from S100 and nuclear extracts. All complexes did not bind to the C-rich or to the double-stranded form of telomeric DNA, indicating that all LaGT proteins have a preference for the G-rich telomeric sequence. In addition, complex LaGT1

besides being the most specific, interacted with a duplex DNA with a 3' G-overhang, a feature shared with other single-stranded telomere binding proteins [20,40]. However, the binding activities of LaGT2 and LaGT3 complexes were inhibited by some of the nontelomeric competitors studied. This suggests that, different from LaGT1, they may associate with a variety of sequence targets or recognize a specific DNA structure, such as the β subunit of *OnTebp* [40]. Similarly to the telomeric proteins described in yeast (*Est1p*), *Clamidomonas reinhardtii* (*Gbp1p*) and *T. brucei* (complex C3) [28,41,42], LaGT proteins also associated with an RNA cognate sequence of the telomeric DNA. In addition, all LaGT complexes as the *Oxytricha* telomere binding proteins [40] were stable in high salt concentrations, suggesting that these protein–telomeric DNA complexes can be maintained by hydrophobic interactions. Although contacts between DNA and proteins can not be generalized, and each example has its own unique features, hydrophobic interactions could play an important role in the features that govern the *in vitro* interaction of LaGT1 and the G-rich telomeric strand as the complex is formed only at 4 °C. Hydrophobic interactions are favored at lower temperatures contributing to the specificity and affinity of binding [43].

Under the conditions used, two proteins of ≈ 35 kDa and ≈ 52 kDa were found in a highly purified form in most of the affinity fractions. Fingerprinting analysis and *de novo* sequencing of the ≈ 35 kDa protein that contained LaGT2 activity showed that it shared identity with the putative amino acid sequence of *LmRbp38*, a protein first described by Sbicego *et al.* [31] as a novel mitochondrial double-stranded and ssRNA-binding protein that is conserved among kinetoplastid. According to these authors, the gene that encodes *Rbp38p* is nuclear in *L. tarentolae* and *T. brucei* (Accession no. AAO39843) and the protein does not contain any known RNA-binding motifs. In addition, LaGT2 activity was found in nuclear and S100 extracts of *L. amazonensis* (Fig. 1), and bound single-stranded telomeric DNA and RNA, with higher affinity for RNA. Moreover, the predicted amino acid sequence of the putative *LmRbp38* shares 70% identity with *Tc38* (data not shown), a DNA-binding protein that recognizes specifically the motif poly[dT-dG] present in *T. cruzi* intergenic regions [36]. According to Duhagon *et al.* [36], *Tc38p* may

Table 4. LaRbp38 (protein-forming complex LaGT2) and LaRpa-1 (protein-forming complex LaGT3) peptide sequences obtained by ESI-MS/MS.

Protein	m/z	Sequence
LaRpa-1	1339.7	IDINPTDLPDVK
	1426.8	EVGSLVDVLGVVLK
LaRbp38	761.4	SSILLTK
	778.4	ENLQFK
	996.5	SNYWLTGR
	1034.5	LQFELNDR
	1262.6	DAELYQWPIK
	1420.6	SNDFNSGLYFTR
	1526.8	KGEAFKLLQDHIK
	1817.8	NSPSNVWIEDWEADR
	2018.0	HLYYNVDQLEDPHLALK
	2405.1	LFHSSQLSGGEALQYQPVSGGSR

have nuclear and mitochondrial localization. Thus, it will be interesting to address if LaRbp38p plays a dual role and if they can be differentiated between a possible telomeric and or a mitochondrial function. Coincidentally, in *Saccharomyces cerevisiae* the mitochondrial helicase Pif1p, has a nuclear form that coimmunoprecipitates with telomeric DNA *in vivo* and inhibits telomerase activity [44].

MS analysis and the sequence tags m/z 1339.7 and m/z 1426.8 obtained by MS/MS *de novo* sequencing (Fig. 5B, Table 4) of the ≈ 52 kDa protein in LaGT3 revealed that it is probably the *L. amazonensis* homologue of *L. infantum* and *L. major* Rpa-1p as the sequence similarities between the LaRpa-1p tags and LiRpa-1p and LmRpa-1p are $\approx 100\%$ (data not shown). Rpa-1p, is one of the three subunits of the eukaryotic heterotrimeric complex Rpa that binds to ssDNA mainly by two of the three structural DNA-binding domains located in subunit 1 [45]. BLAST2 pairwise sequence analysis and CLUSTAL W multialignment showed that the putative *L. major* sequence, like all other kinetoplastid sequences annotated as *Rpa1*, lacked the N-terminal domain (data not shown) that in other eukaryotes is involved only in Rpa-protein interactions and has no function in binding DNA [45]. In addition, at the N-terminal of LiRpa-1p and LmRpa-1p there is a region comprising amino acids 23–104, that shares 98% similarity with an oligonucleotide/oligosaccharide-binding (OB) fold structural domain that binds to nucleic acids [46,47]. OB folds were also found in proteins that cap the G-rich telomeric strand and protect the chromosome ends in ciliate protozoa [40,48], human [20] and yeast [49]. This suggests that, in the absence of *in vivo* studies, one can not exclude the possibility that the kinetoplastid Rpa-1p is most likely a novel protozoan single-stranded telomere binding protein related to a large class of proteins that contains the structural OB fold domains. However, there are some evidences suggesting that Rpa plays a role in telomere maintenance. For example, *S. cerevisiae* *POL12/RPA1* double mutants show reduced telomere length and decreased viability [38]. In addition, the interaction of the yeast telomere-binding protein Cdc13p with the catalytic subunit of pol α and Rpa directly interferes in telomere metabolism as the disruption of this association in *pol1* alleles induces telomere length [19]. Very recently, Schramke *et al.* [50] showed that in yeast, Rpa is present at the telomeres and activates telomerase by loading Est1p onto telomeres during the S phase. Moreover, hRpa-1p was shown to bind ssDNA and when associated with the Werner and Bloom syndrome helicases, actively unwind long telomeric duplex regions that are pre-bound by Trf2p [51]. Whether the *L. amazonensis* ≈ 52 kDa protein identified here is truly a homologue of Rpa-1p or a novel kinetoplastid protein that plays a role in telomere regulation and end capping remains to be determined.

It was not possible to obtain sequence tags from the UV cross-linked LaGT1 complex (≈ 18 –20 kDa band), although the mass spectra analysis of the tryptic peptides obtained by MALDI-TOF MS and ESI-MS/MS (Fig. 5C,D) were similar and revealed that its ≤ 15 kDa protein component do not have homologues in the protein databases. ESI-MS/MS analyses of covalent protein–nucleic acid complexes can be problematic as the two

components possess conflicting requirements for ionization. The combined use of photoactivatable base analogs, such as 5-IdU, and appropriate ESI-MS protocols that have resulted in the successful characterization of different photocrosslinked protein–nucleic acid complexes, may help to identify the LaGT1 protein component [52].

Acknowledgements

The authors thank colleagues in Dr M. I. Cano's laboratory for helpful discussions during the experiments described here, A. C. B. Montes de Oca (Institute of Chemistry, UNICAMP) for helping to determine the protein purification factor and S. Hyslop (School of Medical Sciences, UNICAMP) for critically reading and reviewing the English of the manuscript. This investigation received support from the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR, ID A00753) and from FAPESP (grant 00/01138-6). M. F. F. was supported by a doctoral fellowship from CAPES, Brazil.

References

1. Fu, G. & Barker, D. (1998) Characterisation of *Leishmania* telomeres reveals unusual telomeric repeats and conserved telomere-associated sequence. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2161–2167.
2. Henderson, E. (1995) Telomere DNA Structure. In *Telomeres* (Blackburn, E. & Greider, C., eds), pp. 11–34. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
3. Henderson, E. & Blackburn, E.H. (1989) An overhanging-3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 345–348.
4. Greider, C. (1996) Telomere length regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 337–365.
5. Chan, S.W.-L. & Blackburn, E.H. (2002) New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* **21**, 553–563.
6. McElligott, R. & Wellinger, R.J. (1997) The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J.* **16**, 3705–3714.
7. Wellinger, R.J., Wolf, A.J. & Zakian, V. (1993) *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG_{1–3} tails late in S phase. *Cell* **72**, 51–60.
8. Wellinger, R.J., Ethier, K., Labrecque, P. & Zakian, V.A. (1996) Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* **85**, 423–433.
9. de Lange, T. (2002) Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* **21**, 532–540.
10. Blackburn, E.H. (2000) Telomere states and cell fates. *Nature* **408**, 53–56.
11. Blackburn, E.H. (2001) Switching and signaling at the telomere. *Cell* **106**, 661–673.
12. Lin, J.J. & Zakian, V.A. (1996) The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG_{1–3} telomeric DNA-binding protein *in vitro* that affects telomere behavior *in vivo*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 13760–13765.
13. Nugent, C., Hughes, T., Lue, N. & Lundblad, V.J. (1996) Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* **274**, 249–252.
14. Chandra, A., Hughes, T.R., Nugent, C.I. & Lundblad, V. (2001) Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev.* **15**, 404–414.
15. Evans, S.K. & Lundblad, V.J. (1999) Est1 and Cdc13 as co-ordinators of telomerase access. *Science* **286**, 117–120.
16. Evans, S.K. & Lundblad, V.J. (2000) Positive and negative regulation of telomerase access to the telomere. *J. Cell Sci.* **19**, 3357–3364.

17. Grandin, N., Reed, S.I. & Charbonneau, M. (1997) Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13. *Genes Dev.* **11**, 512–527.
18. Grandin, N., Damon, C. & Charbonneau, M. (2001) Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13. *EMBO J.* **20**, 1173–1183.
19. Qi, H. & Zakian, V.A. (2000) The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase α and the telomerase-associated Est1 protein. *Genes Dev.* **14**, 1777–1788.
20. Baumann, P. & Cech, T.R. (2001) Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and human. *Science* **292**, 1171–1175.
21. Colgin, L.M., Baran, K., Baumann, P., Cech, T.R. & Reddel, R.R. (2003) Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase. *Curr. Biol.* **13**, 942–946.
22. Loayza, D. & de Lange, T. (2003) POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* **26**, 1013–1018.
23. Cano, M.I.N., Dungan, J., Agabian, N. & Blackburn, E.H. (1999) Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 3616–3621.
24. Cano, M.I.N. (2001) Telomere biology of trypanosomatids: more questions than answers. *Trends Parasitol.* **17**, 425–429.
25. Barry, J.D., Ginger, M.L., Burton, P. & McCulloch, R. (2003) Why are parasite contingency genes often associated with telomeres? *Int. J. Parasitol.* **33**, 29–45.
26. Eid, J. & Sollner-Webb, B. (1995) ST-1 a 39-kilodalton protein in *Trypanosoma brucei*, exhibit 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.
27. Eid, J. & Sollner-Webb, B. (1997) ST-2, a Telomere and subtelomere duplex and G-strand binding protein activity in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **272**, 14927–14936.
28. Cano, M.I.N., Blake, J.J., Blackburn, E.H. & Agabian, N. (2002) A *Trypanosoma brucei* protein complex that binds G-overhangs and co-purifies with telomerase activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 896–906.
29. Bryan, T.M. & Cech, T.R. (1999) Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 318–324.
30. Field, H. & Field, M. (1996) *Leptomonas seymouri*, *Trypanosoma brucei*: a method for isolating trypanosomatid nuclear factors which bind *T. brucei* single-stranded G-rich telomere sequence. *Exp. Parasitol.* **83**, 155–158.
31. Sbicego, S., Alfonso, J.D., Estevez, A.M., Rubio, M.A., Kang, X., Turck, C.W., Peris, M. & Simpson, L. (2003) RBP38, a novel RNA-binding protein from trypanosomatid mitochondria, modulates RNA stability. *Eukaryot. Cell* **2**, 560–568.
32. Noll, T.M., Desponds, C., Belli, S.I., Glaser, T.A. & Fasel, N.J. (1997) Histone H1 expression varies during the *Leishmania major* life cycle. *Mol. Biochem. Parasitol.* **84**, 215–227.
33. Sambrook, J. & Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
34. Schnapp, G., Rodi, H.-P., Rettig, W.J., Schnapp, A. & Damm, K. (1998) One-step affinity purification protocol for human telomerase. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3311–3313.
35. Kim, N., Piatyszek, M., Prowse, K., Harley, C., West, M., Ho, P., Coviello, G., Wright, W., Weinrich, S. & Shay, J. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cell and cancer. *Science* **266**, 2011–2015.
36. Duhagon, M.A., Dallagiovanna, B., Ciganda, M., Ruyechan, W., Williams, N. & Garat, B. (2003) A novel type of single-stranded nucleic acid binding protein recognizing a highly frequent motif in the intergenic regions of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **309**, 183–188.
37. Wold, M.S. (1997) Replication Protein A: a heterotrimeric, ssDNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 61–92.
38. 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.
39. Chiurillo, M.A., Cano, M.I., Franco, J.S. & Ramirez, J.L. (1999) Organization of telomeric and sub-telomeric regions of chromosome from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **100**, 173–183.
40. Price, C.M. & Cech, T.R. (1987) Telomeric DNA–protein interactions of *Oxyticha* macronuclear DNA. *Genes Dev.* **1**, 783–793.
41. Virta-Pearlman, V., Morris, D.K. & Lundblad, V. (1996) Est1 has the properties of a single-stranded telomere end-binding protein. *Genes Dev.* **10**, 3094–3104.
42. Johnston, S., Lew, J. & Berman, J. (1999) Gbp1, a protein with RNA recognition motifs, binds single-stranded telomeric DNA and changes its binding specificity upon dimerization. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 923–933.
43. Privalov, P.L. & Gill, S.J. (1988) Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *Adv. Protein Chem.* **39**, 191–234.
44. Bessler, J.B., Torredagger, J.Z. & Zakian, V.A. (2001) The Pif1p subfamily of helicases: region-specific DNA helicases? *Trends Cell. Biol.* **11**, 60–65.
45. Bochkareva, E., Korolev, S., Less-Miller, S.P. & Bochkarev, A. (2002) Structure of the RPA trimerization core and its role in the multistep DNA-binding mechanism of RPA. *EMBO J.* **21**, 1855–1863.
46. Murzin, A.G. (1993) OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J.* **12**, 861–867.
47. Bochkareva, A., Pfuetzner, R.A., Edwards, A.M. & Frappier, L. (1997) Structure of the single-stranded-DNA-binding domain of replication protein A bound to DNA. *Nature* **385**, 176–181.
48. Wang, W., Skopp, R., Scofield, M. & Price, C. (1992) *Euplotes crassus* has genes encoding telomere-binding proteins and telomere-binding protein homologs. *Nucleic Acids Res.* **20**, 6621–6629.
49. Mitton-Fry, R.M., Anderson, E.M., Hughes, T.R., Lundblad, V. & Wuttke, D.S. (2002) Conserved structure for single-stranded telomeric DNA recognition. *Science* **296**, 145–147.
50. Schramke, V., Luciano, P., Brevet, P., Guillot, S., Corda, Y., Longhese, M.P., Gilson, E. & Géli, V. (2004) RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends. *Nature Genet.* **36**, 46–54.
51. Opreko, P.L., von Kobbe, C., Laine, J.-P., Harrigan, J., Hickson, I.D. & Bohr, V. (2002) Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom Syndrome helicases. *J. Biol. Chem.* **275**, 41110–41119.
52. Wong, D., Pavlovich, J.G. & Reich, N.O. (1998) Electrospray ionization mass spectrometric characterization of photocrosslinked DNA–EcoRI DNA methyltransferase complexes. *Nucleic Acids Res.* **26**, 645–649.

5.2. RESULTADOS COMPLEMENTARES

5.2.1. Detecção de atividade de telomerase em extratos S100 e nuclear de *L. (L.) amazonensis*

É amplamente conhecido que a telomerase além de sintetizar novas repetições teloméricas, é parte integral do complexo de ordem maior que protege os terminais dos cromossomos, na maioria das células eucariotas, por sua interação física com a fita telomérica rica em G [43, 161]. Desta forma, para a identificação de proteínas que se associam *in vitro* à fita telomérica rica em G de *L. (L.) amazonensis*, este trabalho iniciou-se pela detecção de atividade de telomerase desse parasita. Para isso, inicialmente foram utilizados extratos semipurificados S100 e nuclear de formas promastigotas do parasita. As frações protéicas foram obtidas por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-agarose (detalhes no item 5.1) e a atividade enzimática foi detectada utilizando-se o ensaio "One Tube TRAP" com uma modificação do protocolo original [77, 170]. Resumidamente, depois da elongação do oligonucleotídeo TS (senso) pela telomerase os produtos foram amplificados utilizando-se o oligonucleotídeo ACX (antisenso), reduzindo-se significativamente a possibilidade de artefatos nas reações de PCR ("primer-dimer") [170], os quais são freqüentes com o uso do oligonucleotídeo CX [77]. Assim, foi possível detectar atividade de telomerase na fração de 500 mM de NaOAc originada do extrato S100 e na fração de 700 mM de NaOAc originada do extrato nuclear. As reações positivas mostraram bandas típicas ≥ 50 pb com aspecto de incrementos (em degraus de escada) de 6 nt de periodicidade (Figura 20A, linhas 3 e 4), consistente com a síntese da repetição telomérica 5'-TTAGGG-3'. Na reação onde foi omitido o extrato protéico (NE) (Figura 20A, linha 9) não aparecem bandas maiores que as do controle interno do PCR (~36 pb), indicando que a atividade detectada nas frações positivas não foi resultante de artefatos. O controle interno do PCR também foi amplificado em todas as frações de *L. (L.) amazonensis* positivas para telomerase, mostrando que essas frações não contêm proteínas inibidoras da *Taq* polimerase [170].

A presença de atividade de telomerase nos extratos foi confirmada pré-incubando-se os mesmos com RNase A-livre de DNase ou com proteinase K (PK). A atividade enzimática foi abolida quando as frações foram pré-tratadas com concentrações ≥ 50 ng de RNase A-livre de

DNase (Figura 20A, linhas 1, 2, 5-7) ou com 10 µg de PK (Figura 20A, linhas 10 e 11), indicando que os produtos visualizados são originados da elongação do oligonucleotídeo TS pela telomerase presente nos extratos. Nenhum produto do tipo "primer-dimer/PCR" ou outros artefatos foram detectados durante os ensaios realizados.

Para obter o controle interno da reação de TRAP foram utilizados os oligonucleotídeos NT e TSNT como citado anteriormente [170]. A incorporação do controle interno do TRAP é muito usada para medir a atividade de telomerase em amostras clínicas que podem apresentar inibidores da enzima *Taq* polimerase.

A processividade da telomerase é definida como o número total de repetições teloméricas adicionadas ao substrato de DNA. Como controles dessa processividade são utilizados produtos de telomerase sintéticos como o oligonucleotídeo R8 (corresponde ao oligonucleotídeo TS estendido 8 repetições teloméricas no terminal 3'), amplificados por PCR pelo oligonucleotídeo antisenso ACX. Para testar a processividade da telomerase de *L. (L.) amazonensis* foi utilizado 1 fmol/µL do oligonucleotídeo R8 como controle de elongação do oligonucleotídeo TS, conforme descrito [170] e mostrado na Figura 20A (linha 8).

Neste estudo também foi utilizada outra variante do ensaio TRAP, ensaios do tipo "Two Tube TRAP" nos quais a reação de telomerase é realizada em um tubo separado daquele usado na reação subsequente de PCR [175]. Utilizando-se este tipo de ensaio foi possível determinar a processividade da telomerase presente nas frações eluídas da coluna DEAE-agarose dos extratos protéicos de *L. (L.) amazonensis*: S100 (fração de 500 mM NaOAc) e nuclear (fração de 600 mM de NaOAc). O oligonucleotídeo antisenso (reverso) usado na reação de PCR neste ensaio foi o Cx-ext [176]. Os resultados estão mostrados na Figura 20B, como se observa os produtos são muito mais intensos que os observados no ensaio "One Tube TRAP", apareceram produtos ≥ 116 pb com periodicidade de 6 nt (Figura 20B, linhas 4 e 5). Nos controles negativos sem extrato protéico (NE) e sem oligonucleotídeo TS (NTS) (Figura 20B, linhas 2 e 3, respectivamente) nenhum produto foi detectado, indicando que a atividade detectada nas frações positivas não foi resultado de artefatos. O oligonucleotídeo R8 utilizado como controle de elongação do oligonucleotídeo TS, está mostrado na Figura 20B linha 1.

A atividade de telomerase também foi testada nas frações obtidas por cromatografia de afinidade utilizando-se o ensaio "Two Tube TRAP". A fração eluída com 0,6 M de KCl da coluna de afinidade apresentou atividade de telomerase, observando-se bandas típicas ≥ 50 pb

com aspecto de incrementos de 6 nt de periodicidade (Figura 21, linha 7). Como controle positivo da atividade de telomerase em *L. (L.) amazonensis* utilizou-se a fração de 400 mM de NaOAc da coluna de DEAE-agarose originada do extrato S100 (Figura 21, linha 2), cuja atividade é abolida após tratamento com RNase A-livre de DNase (Figura 21, linha 3) ou com PK (Figura 21, linha 4). Quando a fração eluída da coluna de afinidade (0,6 M de KCl) é pré-tratada com RNase A-livre de DNase a atividade de telomerase é abolida (Figura 21, linha 6). Nos controles negativos NE e NTS nenhum produto foi detectado (Figura 21, linhas 1 e 5).

Os extratos protéicos semipurificados por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-agarose e purificados por cromatografia de afinidade em coluna com oligonucleotídeo de sequência telomérica rica em G foram subsequenteiramente utilizados em ensaios de EMSA e "UV cross-linking" para a identificação de outras proteínas que formam complexos com a fita telomérica rica em G de *L. (L.) amazonensis*, como mostrado em Fernández e col. [item 5.1].

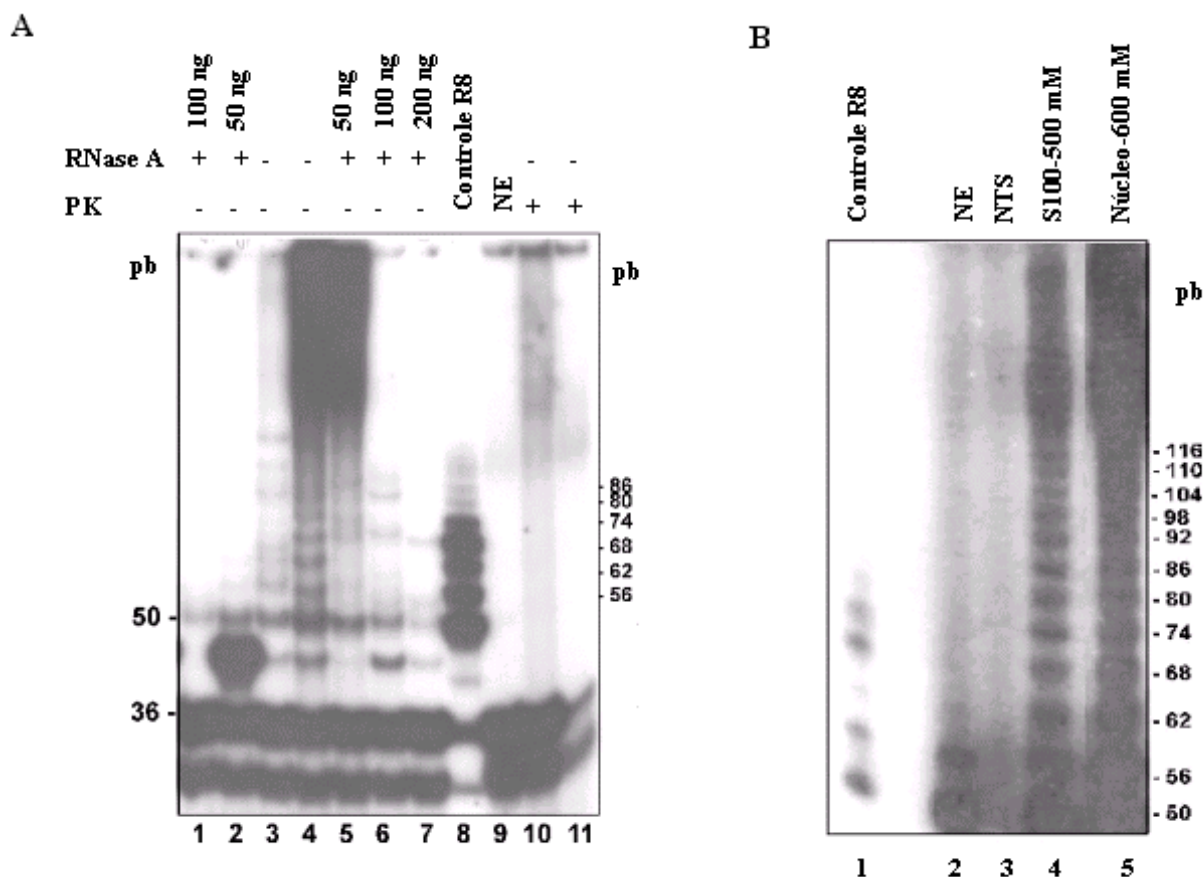


Figura 20. Atividade de telomerase nos extratos S100 e nuclear de *L. (L.) amazonensis*. **A)** Ensaio "One Tube TRAP". Linhas 1-3 e 10, reações usando a fração de 500 mM NaOAc da coluna de DEAE-agarose do extrato S100; linhas 4-7 e 11, reações usando a fração de 700 mM NaOAc da coluna de DEAE-agarose do extrato nuclear; linha 8, produtos da amplificação do oligonucleotídeo controle R8 e linha 9, reação sem extrato protéico (NE). O sinal + indica quando os extratos foram pré-tratados com 10 µg de PK ou com diferentes quantidades de RNase A- livre de DNase como indicado. Os produtos foram fracionados em gel não desnaturante 12,5% v/v (19:1, acrilamida:bis-acrilamida, p/v) em 1X TBE. **B)** Ensaio "Two Tube TRAP". Linha 1, produtos da amplificação do oligonucleotídeo controle R8; linha 2, reação realizada sem extrato protéico (NE); linha 3, reação realizada sem oligonucleotídeo TS (NTS); linha 4, reação realizada usando a fração de 500 mM NaOAc da coluna de DEAE-agarose do extrato S100; linha 5, reação realizada usando a fração de 600 mM NaOAc da coluna de DEAE-agarose do extrato nuclear. Os produtos foram fracionados em gel desnaturante contendo 7 M uréia, 12% v/v (19:1, acrilamida:bis-acrilamida, p/v) em 1X TBE.

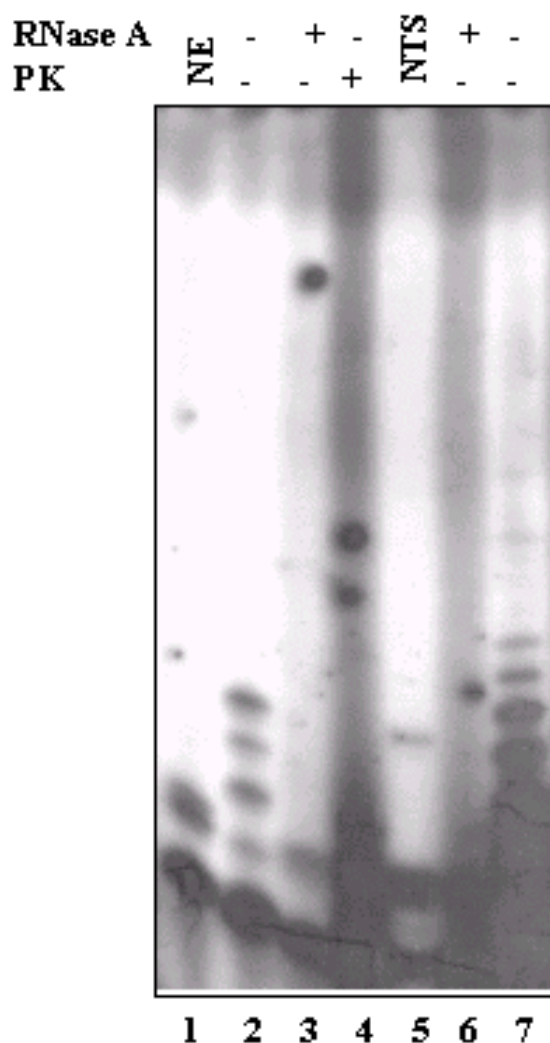
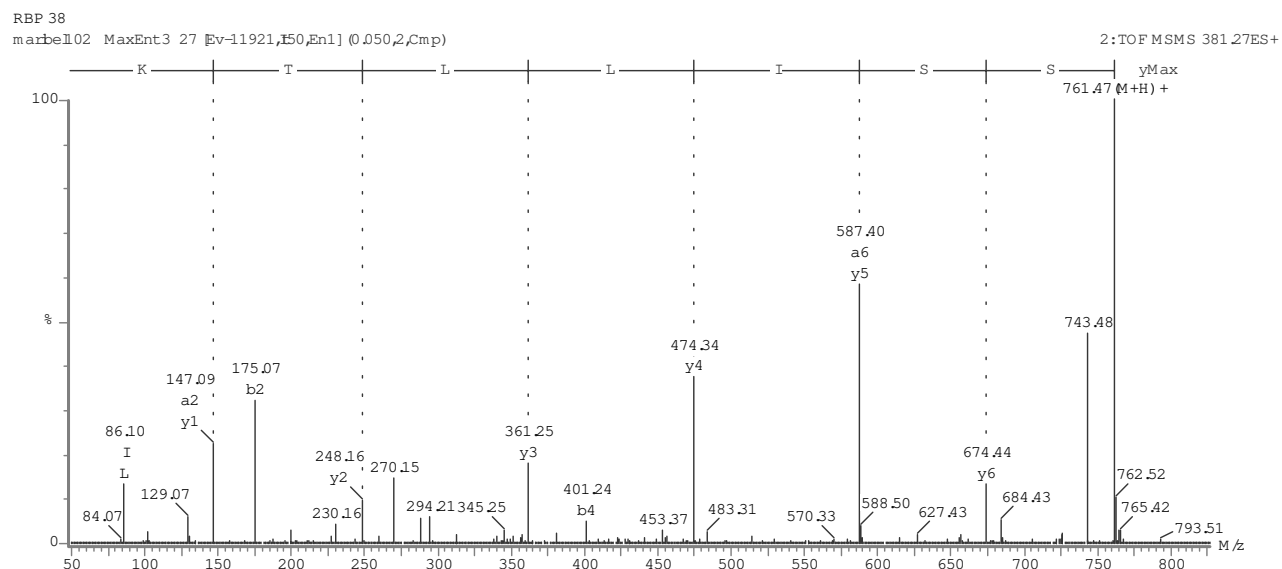


Figura 21. Atividade de telomerase em uma fração eluída da coluna de afinidade do extrato S100 de *L. (L.) amazonensis* testada por ensaio "Two Tube TRAP". Linha 1, reação realizada sem extrato protéico (NE); linha 2, reação realizada usando a fração de 400 mM NaOAc da coluna de DEAE-agarose originada do extrato S100; linha 3, reação realizada usando a fração de 400 mM NaOAc da coluna de DEAE-agarose originada do extrato S100 pré-tratado com RNase A-livre de DNase (1 µg); linha 4, reação realizada usando a fração de 400 mM NaOAc da coluna de DEAE-agarose originada do extrato S100 pré-tratado com proteinase K (10µg); linha 5, reação realizada sem oligonucleotídeo TS (NTS); linha 6, reação realizada com a fração de 0,6 M KCl eluída da coluna de afinidade pré-tratada com RNase A-livre de DNase e linha 7, reação realizada com a fração de 0,6 M KCl eluída da coluna de afinidade. Os produtos foram fracionados em gel desnaturante contendo 7 M uréia, 12% v/v (19:1, acrilamida:bis-acrilamida, p/v) em 1X TBE.

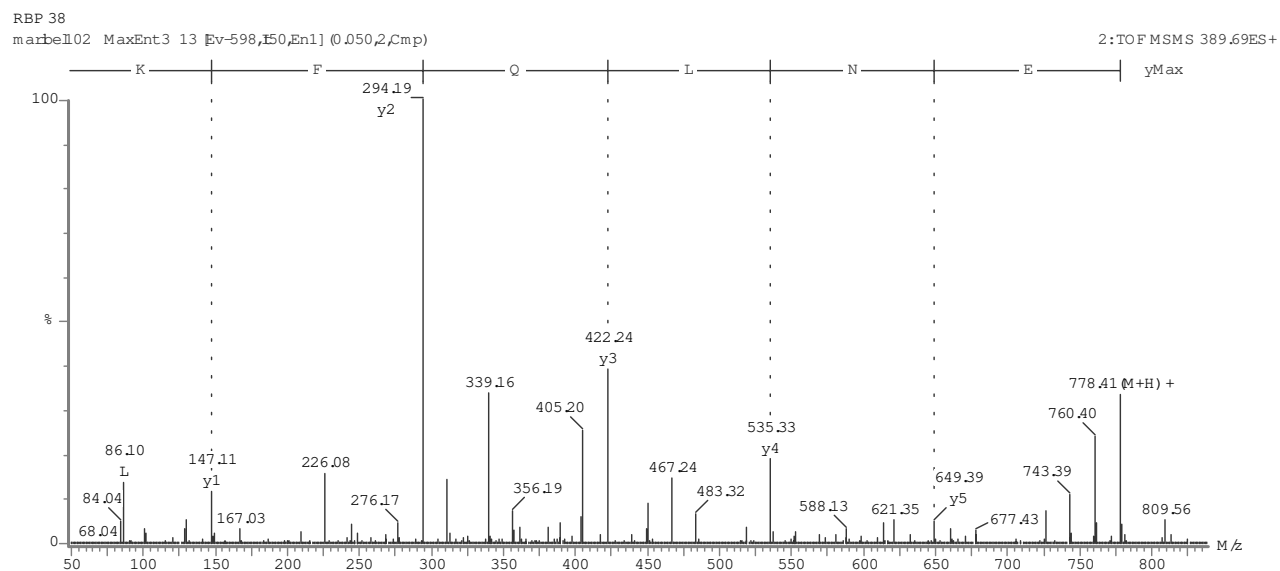
5.2.2. Seqüenciamento por espectrometria de massa (LC/ESI-MS/MS) das proteínas que formam os complexos LaGT1-3

O item 5.1 inclui os resultados do seqüenciamento por espectrometria de massa (LC/ESI-MS/MS) dos componentes protéicos dos complexos LaGT2 e LaGT3. Desafortunadamente, não foi possível seqüenciar os peptídeos trípticos da proteína que forma o complexo LaGT1, mas o espectro de massa da mistura de peptídeos não separados confirmam os resultados do MALDI-TOF [Fernández e col., item 5.1]. Nas Figuras 22 e 23 se apresentam os espectros de massa obtidos da fragmentação de 12 e 2 peptídeos trípticos originados das proteínas que compõem, respectivamente, os complexos LaGT2 (LaRbp38) e LaGT3 (LaRpa-1). Esses peptídeos foram analisados comparando-se as seqüências parciais dos mesmos com as seqüências de peptídeos disponíveis nos bancos de dados: Swiss-Prot, NCBIInr e Genpept do programa de análises MS-FIT 4.0 Protein Prospector (Baker, P. R. and Clauser, K. R., www.prospector.ucsf.edu) e do projeto genoma de *Leishmania* (www.ebi.ac.uk/parasites/leish.html). Os resultados das análises confirmou os obtidos por MALDI-TOF, como mostrado em [Fernández e col., item 5.1] e na Figura 24. Os peptídeos trípticos obtidos das proteínas de *L. (L.) amazonensis* que foram seqüenciados apresentaram 100% de homologia com seqüências peptídicas obtidas da tradução dos genes *LmRpb38* (No. acesso GenBank CAB71224.1) e *LmRpa-1* (contig LmjF28_07_20031115_V2.0) de *L. (L.) major*.

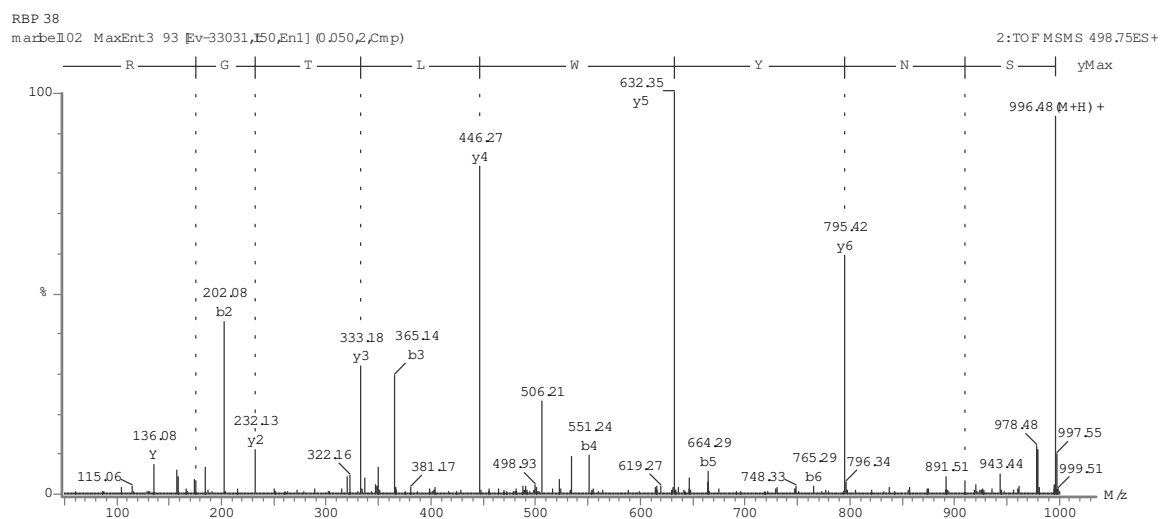
A)



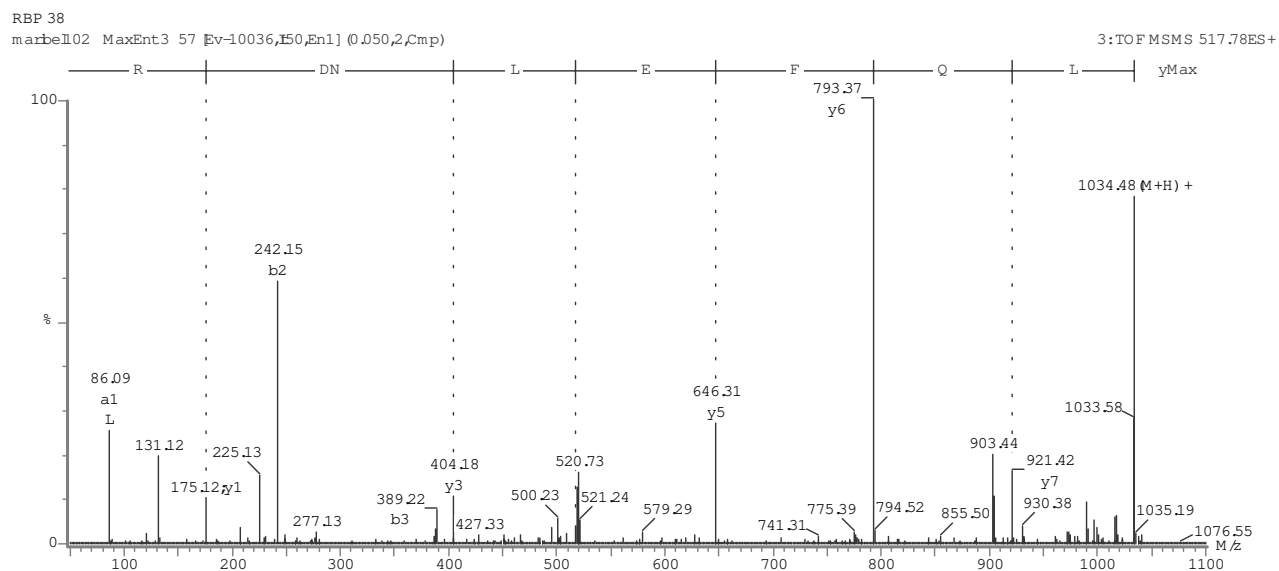
B)

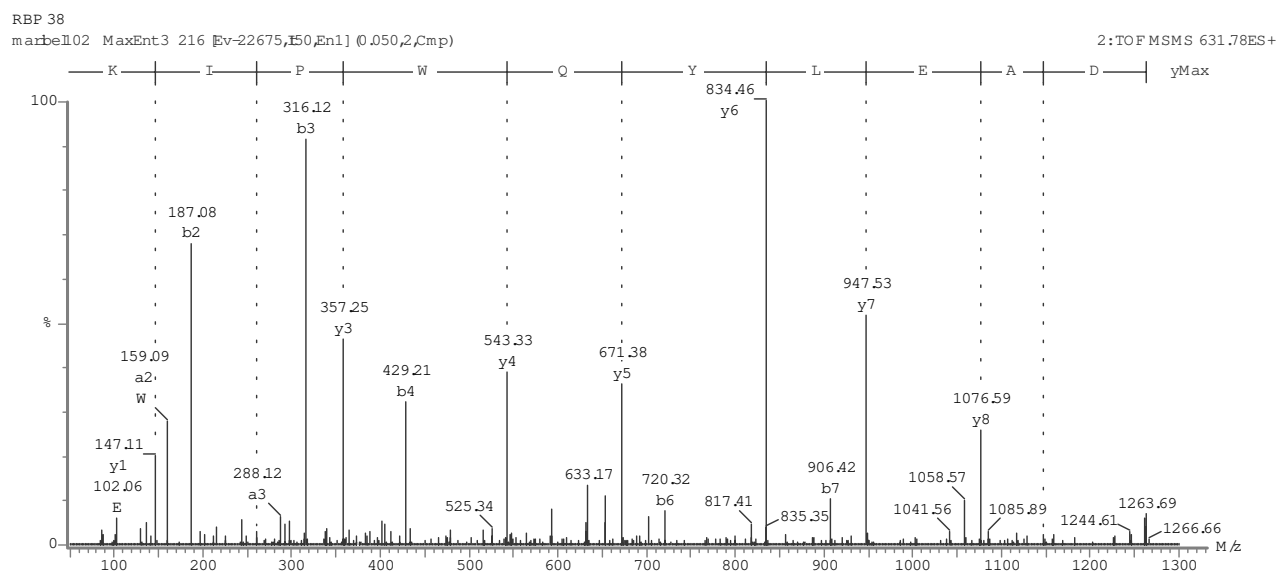
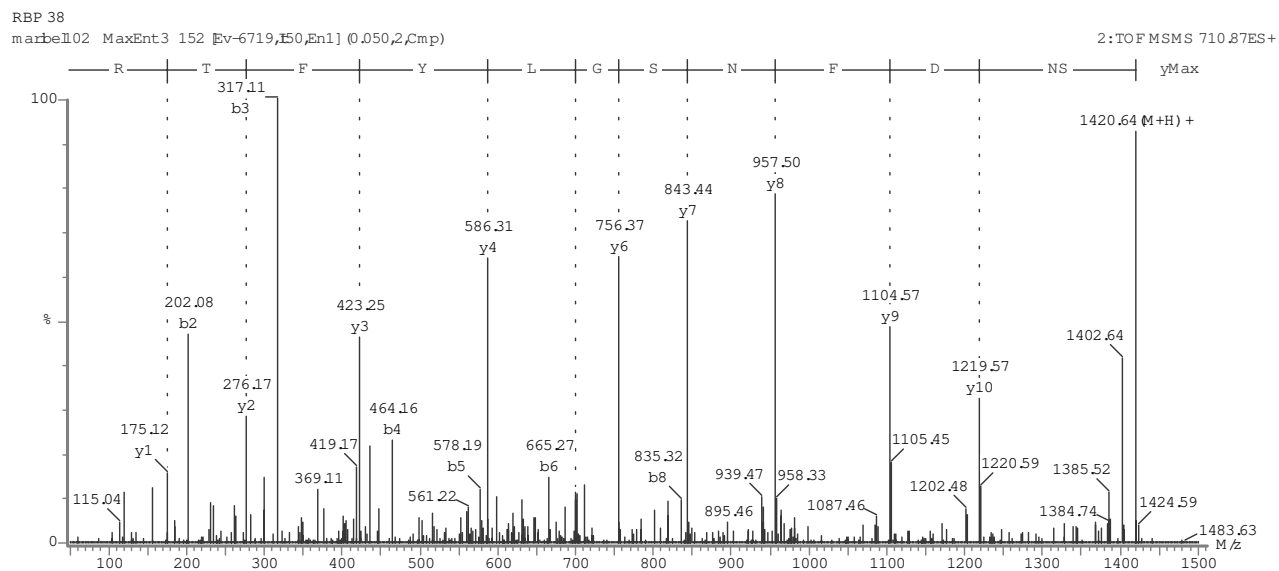


C)

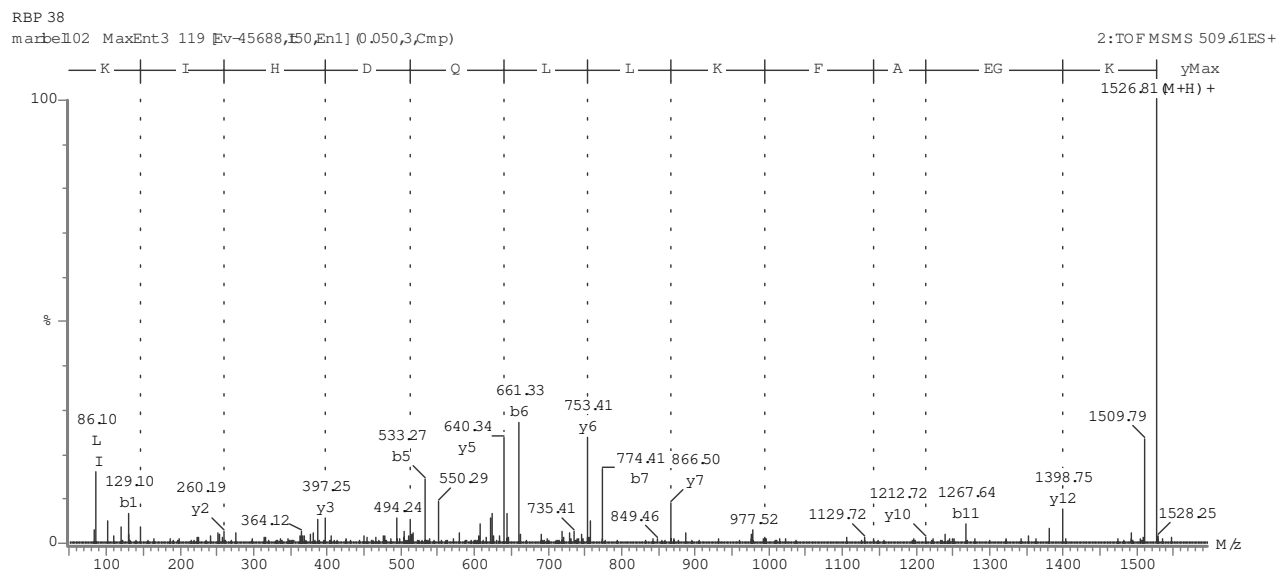


D)

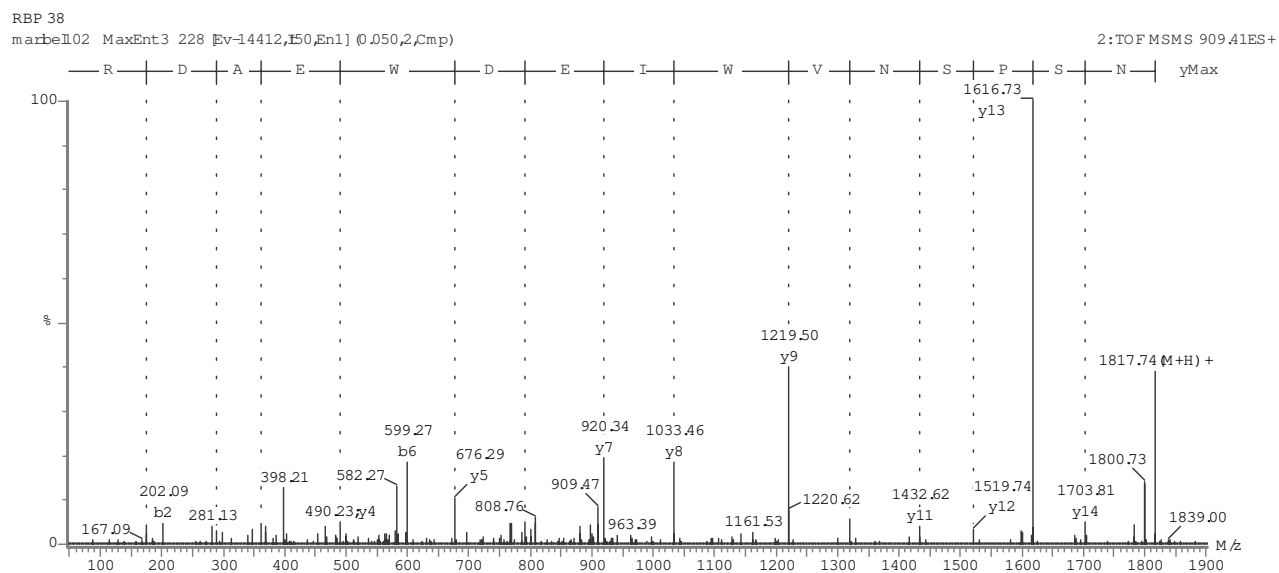


E)**F)**

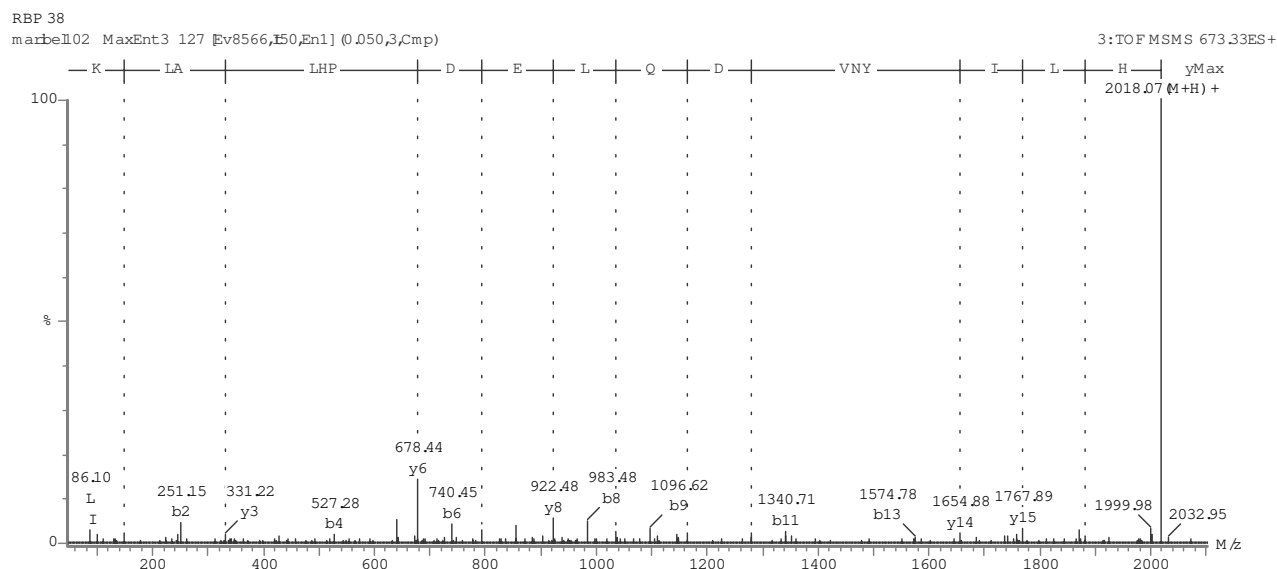
G)



H)



D)



J)

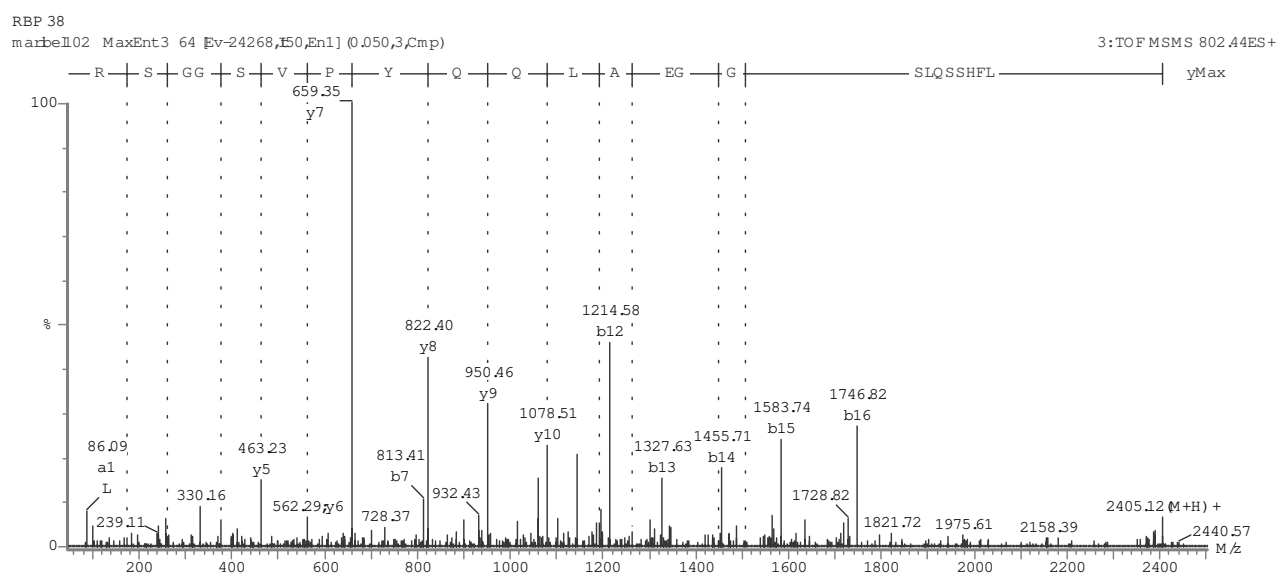
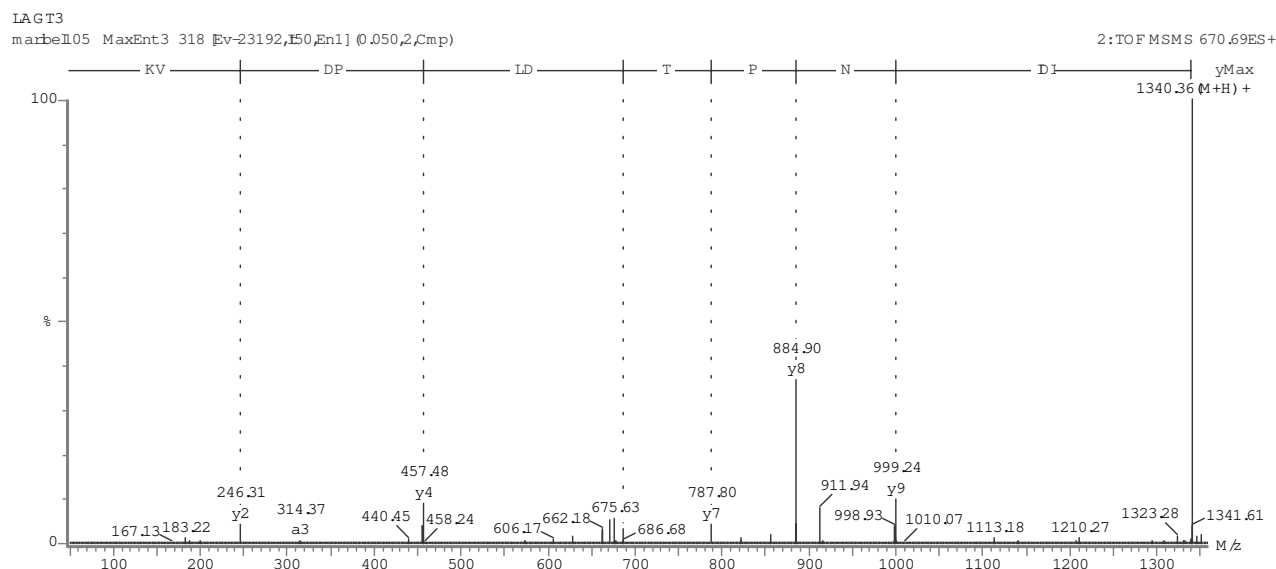


Figura 22. Sequenciamento por espectrometria de massa (LC/ESI-MS/MS) do componente protéico do complexo LaGT2 (LaRbp38). Em A-J) espectros de massa dos peptídeos tripticos (761,47 m/z; 778,41 m/z; 996,48 m/z; 1034,48 m/z; 1263,69 m/z; 1420,64 m/z; 1526,81 m/z; 1817,74 m/z; 2018,07 m/z e 2405,12 m/z) da proteína LaRbp38 purificada por cromatografia de afinidade. As seqüências completas ou parciais de cada peptídeo foram geradas manualmente com auxílio do programa Micromass que permite interpretar a massa de fragmentação. A ordem da leitura da seqüência peptídica é da direita para esquerda.

A)



B)

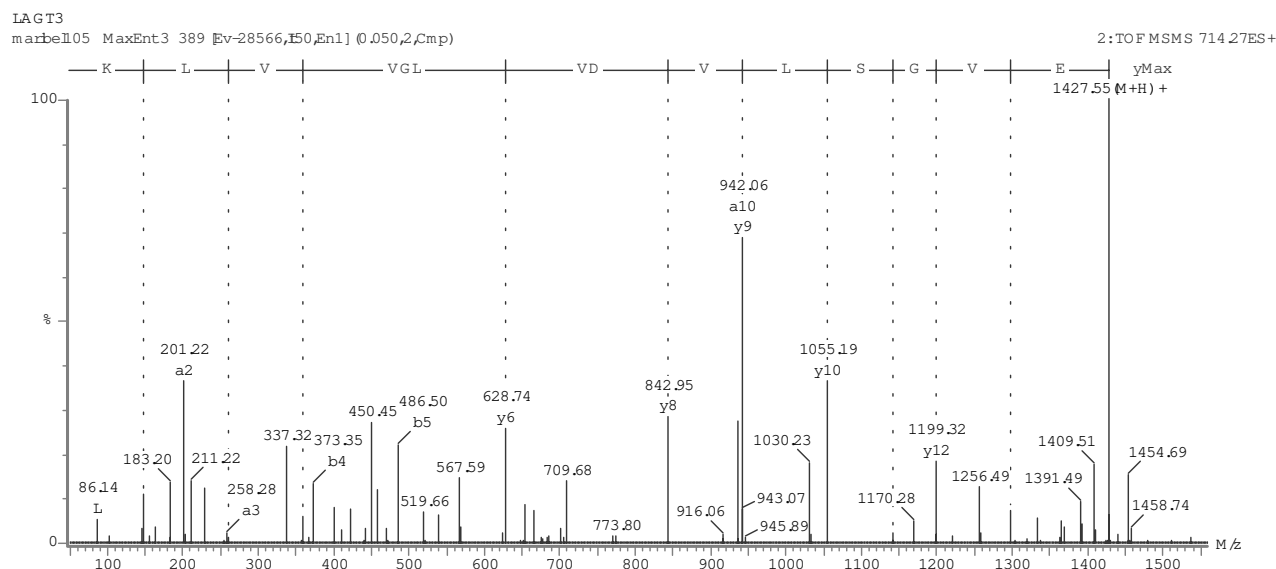


Figura 23. Sequenciamento por espectrometria de massa (LC/ESI-MS/MS) do componente protéico do complexo LaGT3 (LaRpa-1). Em A) e B), espectro de massa dos peptídeos triptícos (1340.36 m/z e 1427.55 m/z) da proteína LaRpa-1 purificada por cromatografia de afinidade. As seqüências completas ou parciais de cada peptídeo foram geradas manualmente com auxílio do programa Micromass que permite interpretar a massa de fragmentação. A ordem da leitura da seqüência peptídica é da direita para esquerda.

A*

MLRRVSLSALVQRVAAGAVIATAGRTIVVFSQQHHILES NQRARN **NSPSNVWIEDWEADRL**
 GMKPEPGALPTQLVLDKQLELFNFDQLLSPPEVMEAPKHSSYSSRKVYGERL **QFELNDRA**
 QRHSYQSKWWITRGQAYKEN **LQFKANARSSILLTKSQIKLFHSSQLSGGEALQQYPVSGG**
SRRVYSKKGAEFQLLQDHIKS NDFNSGLYFTR RQMEFFKLAPLPDQVPVQEAATGDRHL
IYNVDQLEDPHLALKTL QRAPVNVPTFLLSGEPIMS ENTRKFPKTFRS **SNYWL TGRDAELY**
QWPIKESERRRGVPFSTGT SAPVQYELFNVEQLSNPDEAFARAGLLIQ

B

MQQPGSHQIQPIDSLTPFLGGKWWIRARVTDKTDIRTWNKPTSQGKLFSTLIDESAAIR
 ATVFNDAVDTFEPLIVNGQVYFSGGQVKANRRFSNVNNDYELTFDRSSEIMLARQDTS
 TAALPMQRYNFVPIELLKQRE **EVGSLVDVLGVVLK** VDEVSSITQKSTGRELMKRNVMGDM
 TAAVEVTFWNDEAKAWCYPVGTVVALRQLKVG SFDGVTLSSTYQTK **IDINPTDLPDVKKL**
 ATWYVATGGANVTSLSSQGLGAASGAGGESDRGRKYLDEIQSEGIGRGLKPEYVDVRCVP
 IYFKQDAQWYDACPTCNKKVTEEGAQGD RFRCEKCDKTVTPTQRYLVS IQVTDNVSQAWL
 TLFNEAGIEFFGMEAAELKRR AQEDPLYIAKLAQGRMNRPVVMRLRVKEEMSSNSMTGEE
 SDRLRMSVVRIS EFMPIAGTSEETRRRLAQNLRTECDEILRLIEAYV

Figura 24. Localização das seqüências dos peptídeos trípticos de LaGT2 e LaGT3 obtidas por espectrometria de massa nas seqüências homólogas das proteínas obtidas nos bancos de dados. Em A) e B) estão as seqüências previstas de aminoácidos de *LmRbp38* (No. acesso GenBank CAB71224.1) e *LmRpa-1* (contig LmjF28_07_20031115_V2.0), respectivamente, com as quais as massas dos peptídeos trípticos de LaGT2 e LaGT3 apresentaram homologia quando analisadas pelo programa MS-Fit 4.0 e com o banco de dados do projeto genoma de *Leishmania*. Em azul, as seqüências completas ou parciais obtidas por LC/ESI-MS/MS (Figuras 21 e 22), de alguns peptídeos trípticos de LaGT2 e LaGT3. Note-se que as seqüências peptídicas obtidas das proteínas de *L. (L.) amazonensis* compartilham 100% de identidade com as seqüências peptídicas previstas de *L. (L.) major*.

5.2.3. Caracterização adicional dos complexos proteína-DNA telomérico de *L. (L.) amazonensis*: LaGT1-LaGT3

5.2.3.1. Análise da interação do complexo LaGT1 com o DNA telomérico

Como foi descrito anteriormente (item 5.1), três complexos DNA-proteína que interagem com a fita telomérica rica em G foram identificados nas frações da coluna de DEAE-agarose originadas dos extratos protéicos S100 e nuclear de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* utilizando-se ensaios de EMSA. LaGT1 foi identificado como o complexo de maior mobilidade eletroforética, o mais abundante nos dois extratos protéicos e o complexo que se associa mais especificamente com a fita telomérica rica em G [Fernández e col., item 5.1]. A purificação dos extratos S100 e nuclear em coluna de troca iônica DEAE-agarose, mostrou que LaGT1 foi obtido em todas as frações das colunas eluídas com concentrações de 75-800 mM de NaOAc.

Para analisar a interação do complexo LaGT1 com o DNA telomérico de *L. (L.) amazonensis* foram realizados testes de interação (reações *in vitro* de interação proteína-DNA por EMSA) utilizando-se a fração de 400 mM de NaOAc da coluna de DEAE-agarose do extrato S100 e diferentes oligonucleotídeos contendo a sequência telomérica rica em G de *L. (L.) amazonensis*. Para estes ensaios foram utilizados oligonucleotídeos contendo permutações da sequência telomérica no terminal 3' (oligonucleotídeos Tel1-Tel6, Tabela 1 do item 5.1) e oligonucleotídeos com 5 e 6 repetições da sequência telomérica (oligonucleotídeos Tel30 e Tel36, item 4.4.4), marcados radioativamente no terminal 5' com a enzima polinucleotídeo quinase do bacteriófago T4. Os produtos dessas reações foram submetidos a EMSA e a "UV cross-linking" como mostrado nas Figuras 25A e 25B. Os resultados mostram que o complexo LaGT1 é formado com todos os oligonucleotídeos de sequência telomérica Tel1 a Tel6 (Figuras 25A e 25B, linhas 2-7). Esse complexo também é formado com os oligonucleotídeos das sequências teloméricas de 30 nt (Tel30) e 36 nt (Tel36) (Figuras 25A e 25B, linhas 9 e 11, respectivamente). Utilizando-se ensaio de "UV cross-linking" seguido de fracionamento por SDS-PAGE mostra-se que LaGT1 é formado ao menos por duas bandas de tamanho aproximado de 18-20 kDa (Figura 25B, linhas 2-7).

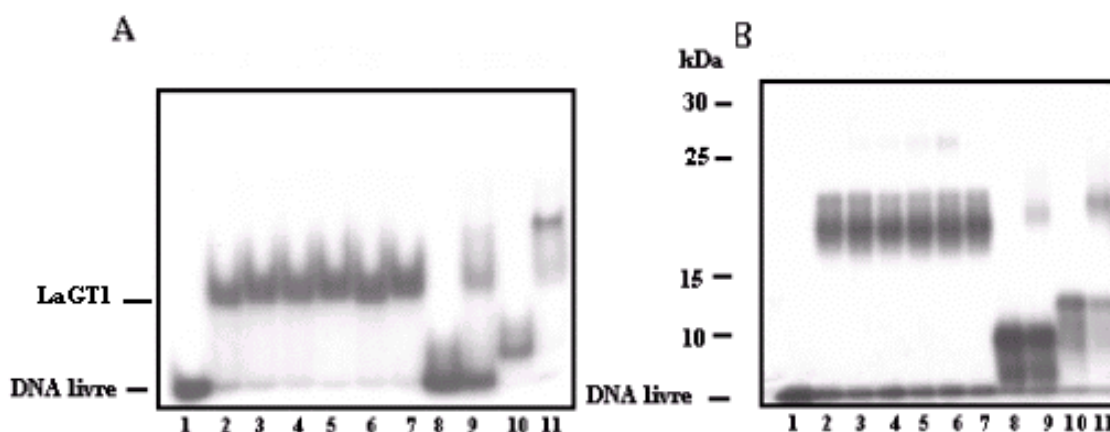


Figura 25. O complexo LaGT1 é formado com oligonucleotídeos de sequências teloméricas ricas em G permutadas na extremidade 3' (Tel1-Tel6) assim como com Tel30 e Tel36. A) EMSA e **B)** Ensaio de "UV cross-linking" utilizando-se a fração de 400 mM NaOAc da coluna de DEAE-agarose originada do extrato S100 e os oligonucleotídeos Tel1 (linhas 2), Tel2 (linhas 3), Tel3 (linhas 4), Tel4 (linhas 5), Tel5 (linhas 6), Tel6 (linhas 7), Tel30 (linhas 9) e Tel36 (linhas 11) marcados radioativamente no terminal 5'. Reações sem extrato protéico (linhas 1, 8 e 10). Os produtos foram fracionados em: **A)** em gel não desnaturante 6% em 0,5X TBE e em **B)** em gel de SDS-PAGE 12% usando-se tampão de amostra para proteínas contendo 2-mercaptoetanol.

5.2.3.2. Estimativa das constantes de dissociação (K_d) dos complexos LaGT1-LaGT3 com seqüências teloméricas ricas em G

Como parte da caracterização dos complexos proteína-DNA telomérico LaGT1-LaGT3 de *L. (L.) amazonensis* foram analisadas outras propriedades de interação com seqüências simples fitas teloméricas (na forma de DNA para LaGT1 e de DNA e RNA para LaGT2 e LaGT3), estimando-se as constantes de dissociação (K_d) dos três complexos.

A K_d do complexo LaGT1 foi estimada utilizando-se 9 fmol do oligonucleotídeo de seqüência telomérica simples fita na forma de DNA Tel6 (Tabela 1 do item 5.1) e diluições seriadas em duplicata das frações obtidas por cromatografia de troca iônica dos extratos S100 (400 mM de NaOAc) e nuclear (500 mM de NaOAc) (item 5.1). Dados das análises quantitativas desses ensaios por Scion Image para Windows (www.scioncorp.com), foram plotados em gráficos de regressão não linear a fim de se obter os valores de K_d usando o programa GraphPad Prism (versão 4.0, 2003; www.graphpad.com). As curvas resultantes estão mostradas na Figura 25. A K_d estimada para o complexo LaGT1/Tel6 formado a partir de proteínas do extrato S100 e do extrato nuclear foi de 12,80 nM.

As K_d dos complexos LaGT2 e LaGT3 foram estimadas como para LaGT1, utilizando-se os oligonucleotídeos de seqüências teloméricas simples fita nas formas de DNA (Tel6) e RNA (Tel6RNA) (tabela 1 do item 5.1). Para esses ensaios foram utilizadas diluições seriadas em duplicata das frações obtidas por cromatografia de afinidade do extrato S100 (item 5.1), que apresentavam atividade de LaGT2 (0,6 M de KCl) e LaGT3 (2,2 M de KCl) e 5 fmol dos oligonucleotídeos acima mencionados. Os valores das K_d foram obtidas plotando-se dados das análises quantitativas dos ensaios em gráficos de regressão não linear usando o programa GraphPad Prism (versão 4.0, 2003; www.graphpad.com). As curvas resultantes estão mostradas nas Figuras 27A e 27B. Os valores das K_d estimadas para cada complexo foram: LaGT2/Tel6, 16,62 nM; LaGT2/Tel6RNA, 1,50 nM; LaGT3/Tel6, 9,02 nM e LaGT3/Tel6RNA, 2,06 nM.

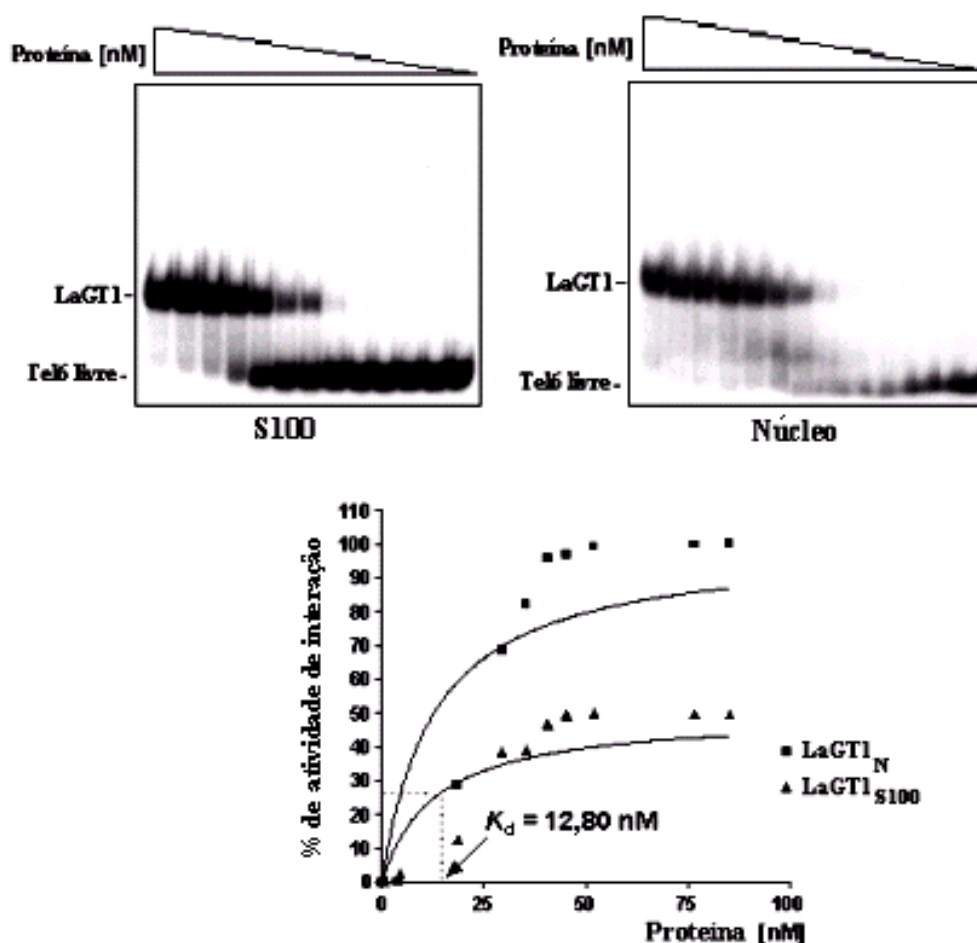


Figura 26. Estimativa da constante de dissociação (K_d) do complexo LaGT1 formado com proteínas de extrato S100 e de extrato nuclear de *L. (L.) amazonensis* e o oligonucleotídeo de sequência telomérica simples fita na forma de DNA (Tel6). A K_d foi estimada por EMSA utilizando-se 9 fmol do oligonucleotídeo Tel6 marcado radioativamente e diluições seriadas em duplicata das frações obtidas por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-agarose: frações de 400 mM NaOAc do extrato S100 e de 500 mM NaOAc do extrato nuclear, que contêm atividade de LaGT1. Após as análises quantitativas dos resultados usando o programa Scion Image para Windows, os valores de K_d foram estimados por regressão não linear usando o programa GraphPad Prism. O valor da K_d estimada para o complexo LaGT1/Tel6 em ambos extratos foi 12,80 nM.

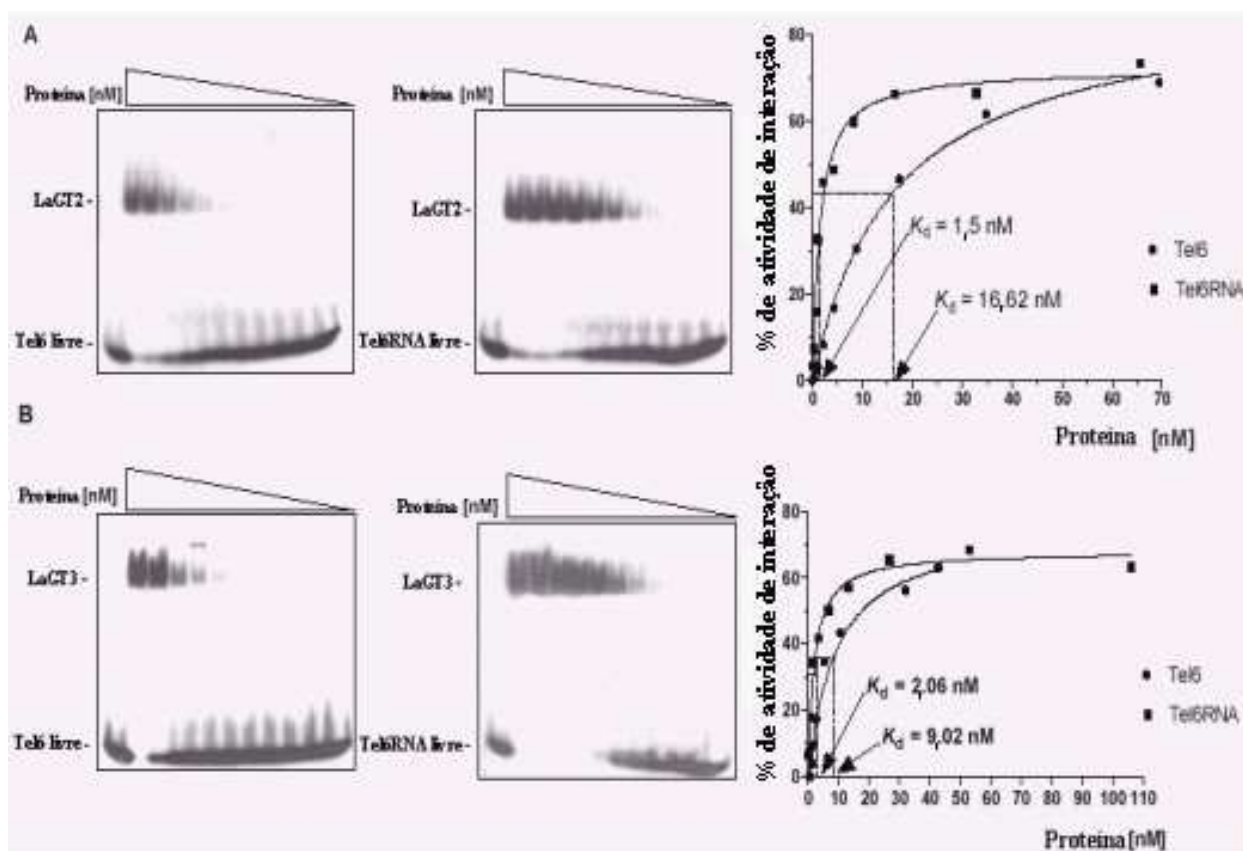


Figura 27. Estimativa das constantes de dissociação (K_d) dos complexos LaGT2 e LaGT3 com oligonucleotídeos de seqüências teloméricas simples fita nas formas de DNA (Tel6) e RNA (Tel6RNA). Em A) e B) as K_d foram estimadas a partir da análise quantitativa de EMSA utilizando-se 5 fmol dos oligonucleotídeos marcados radioativamente: Tel6 (esquerda) ou Tel6RNA (direita) e diluições duplicadas seriadas das frações obtidas por cromatografia de afinidade que apresentavam atividade de LaGT2 e LaGT3, respectivamente 0,6 M KCl e 2,2 M KCl. Após as análises quantitativas dos resultados usando o programa Scion Image para Windows, os valores das K_d foram estimados por regressão não linear usando o programa GraphPad Prism. **A) Estimativa das K_d dos complexos LaGT2/Tel6 (16,62 nM) e LaGT2/Tel6RNA (1,50 nM). **B)** Estimativa das K_d dos complexos LaGT3/Tel6 (9,02 nM) e LaGT3/Tel6RNA (2,06 nM).**

5.2.3.3. Ensaio de renaturação das proteínas que fazem parte dos complexos LaGT2 e LaGT3 de *L. (L.) amazonensis*

Como foi mostrado no item 5.1 (Fernández e col., 2004) duas bandas protéicas coradas por Coomassie e com tamanhos aproximados de 35 kDa e 52 kDa foram eluídas em todas as frações da coluna de cromatografia de afinidade. Para confirmar quais delas continham atividade de LaGT2 e LaGT3, respectivamente, procedeu-se com os ensaios de renaturação seguido de ensaio de atividade de interação com DNA telomérico ("UV-cross-linking"). Para tal cortou-se de um gel de proteínas (SDS-PAGE) as bandas coradas por Coomassie eluídas com 1 M KCl da coluna de afinidade. Essas bandas tinham massa molecular aproximada de 35 kDa, 52 kDa e 65 kDa. As proteínas correspondentes a cada banda foram desnaturadas com 6 M guanidinium-HCl e renaturadas por diluição segundo protocolo de Hager e Burgess [174]. Após a renaturação foi realizado ensaio de "UV cross-linking" para confirmar as atividades de formação dos complexos. As proteínas renaturadas contidas nas bandas de ~35 kDa e ~52 kDa apresentaram atividades de LaGT2 e LaGT3, respectivamente (Figura 28, linhas 1 e 2). A proteína renaturada contida na banda de ~65 kDa não formou nenhum complexo com o DNA telomérico (Figura 28, linha 3). Nenhuma das proteínas renaturadas demonstrou atividade de LaGT1.

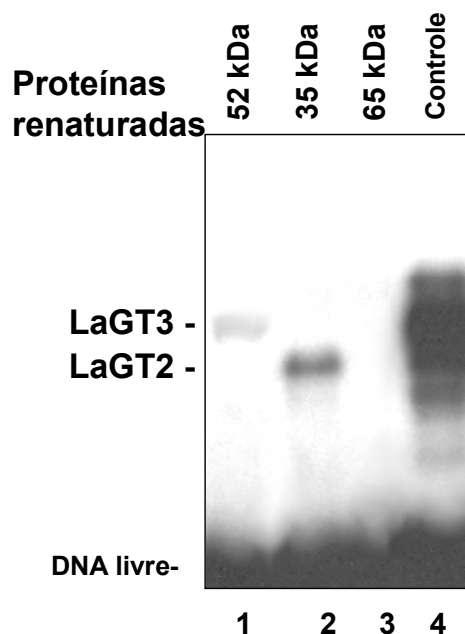


Figura 28. Renatura  o das bandas protéicas presentes na fra  o de 1 M KCl eluída da coluna da cromatografia de afinidade. Ensaio de "UV cross-linking" realizado com as proteínas renaturadas contidas nas bandas de ~52 kDa (linha 1), ~35 kDa (linha 2) e ~65 kDa (linha 3) e o oligonucleotídeo Tel6 marcado radioativamente. Linha 4, controle: ensaio de "UV cross-linking" realizado com a fra  o de 1 M da coluna da cromatografia de afinidade que apresenta atividade dos complexos LaGT2 e LaGT3.

5.2.3.4. Análise conformacional por espectroscopia de fluorescência da proteína renaturada LaRpa-1 na presença ou ausência do oligonucleotídeo de seqüência telomérica simples fita Tel6

Para este estudo utilizou-se proteínas renaturadas a partir de géis de SDS-PAGE. Como as quantidades de proteínas obtidas por esse método são insignificantes, seguiu-se os experimentos com a proteína LaRpa-1, que tem atividade de LaGT3 já que as quantidades de LaRbp38 foram insuficientes.

Este ensaio foi realizado com a proteína LaRpa-1 renaturada segundo protocolo descrito no item anterior (5.2.1.3) na presença ou ausência de um excesso (50 fmol) de oligonucleotídeo de seqüência telomérica Tel6 (Tabela 1 do item 5.1). Os resultados preliminares da análise conformacional por espectroscopia de fluorescência da proteína LaRpa-1 associada ou não    seqüência telomérica rica em G estão mostrados na Figura 29 e na Tabela 2.

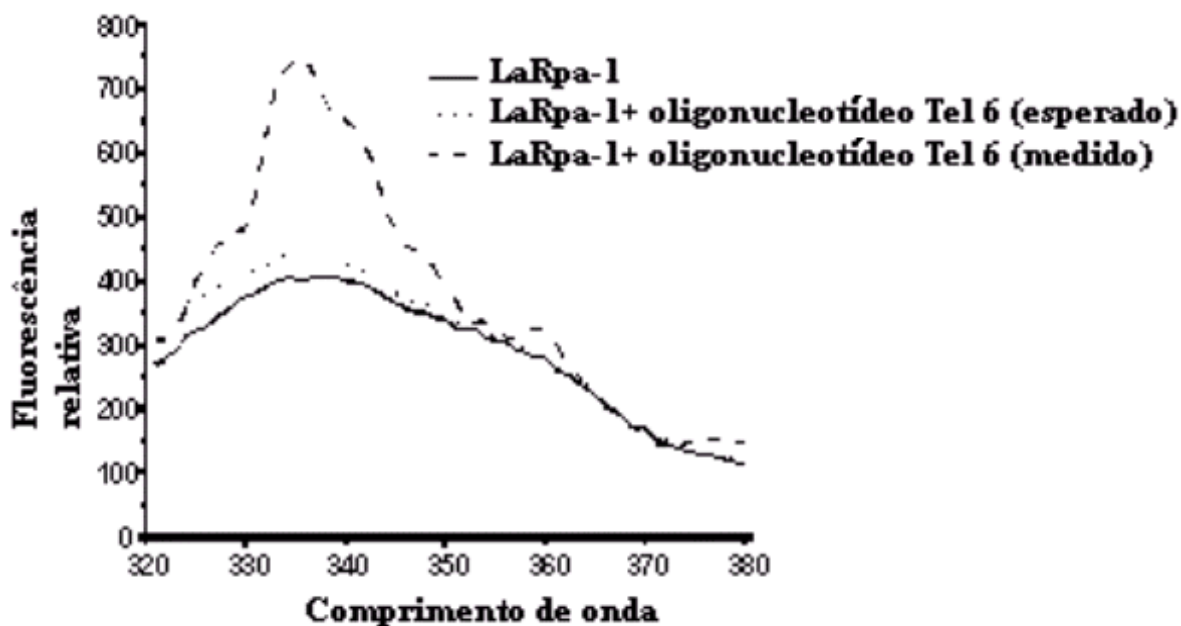


Figura 29. Espectro de emissão de fluorescência da proteína LaRpa-1 na presença ou ausência do oligonucleotídeo de sequência telomérica simples fita rica em G de *L. (L.) amazonensis* Tel6. Para este ensaio foi utilizada a proteína LaRpa-1 renaturada e um excesso de oligonucleotídeo de sequência telomérica Tel6 (50 fmol). Os ensaios de interação proteína:DNA foram realizados à 4 °C em tampão contendo 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM MgCl₂; 5% glicerol v/v. O comprimento de onda de excitação usado foi 295 nm com banda de excitação de 4 nm e banda de emissão de 16 nm. Os espectros de emissão desde 320 nm até 380 nm a 23 °C, foram obtidos individualmente do tampão, do oligonucleotídeo Tel6 e da proteína renaturada na presença ou ausência de Tel6.

Tabela 2 . Parâmetros da fluorescência

	Comprimento de onda máximo	Comprimento de onda do centro de massa	Medida da área na base do espectro (320-380 nm)
LaRpa-1	337	345	17257
LaRpa-1 + Tel6 (valor esperado)*	337	344	18238
LaRpa-1 + Tel6 (valor medido)	336	345	22596

*Valor esperado: soma dos espectros de emissão de fluorescência do oligonucleotídeo Tel6 e da proteína LaRpa-1.

O resultado apresentado na Figura 29 mostra que alguns resíduos de Trp em LaRpa-1 estão imersos em um ambiente hidrofóbico, no interior da proteína. Porém, o cálculo do centro

de massa indica que, em média, alguns resíduos de Trp encontram-se tanto expostos parcialmente ao solvente (tampão), como também há resíduos de Trp no interior da proteína. Quando a proteína é testada na presença do oligonucleotídeo Tel6 (a reação de interação foi realizada a 4 °C por 30 min) ocorre uma modificação no espectro de emissão de fluorescência, indicando uma interação entre Tel6 e LaRpa-1. Como mostrado no espectro apresentado na Figura 29, essa interação causa modificações no ambiente dos resíduos de Trp, detectado pelo aumento na intensidade da fluorescência (aproximadamente 25% de aumento da área na base da curva). Porém, nenhuma modificação no comprimento de onda máximo ou no centro de massa foi identificado.

5.2.4. Clonagem e caracterização do gene *LaRpa-1*

5.2.4.1. Clonagem do gene *LaRpa-1* utilizando-se amplificação por PCR

De acordo com as análises das massas obtidas dos peptídeos tripticos da proteína nativa (banda de ~52 kDa, item 5.1) utilizando-se o programa de análises MS-FIT 4.0 Protein Prospector e da sequência dos peptídeos obtidos por ESI-MS/MS (Fernández e col. item 5.1 e Figuras 22 e 23), o componente protéico do complexo telomérico LaGT3 apresentou alta similaridade com a subunidade 1 da proteína de replicação A de *L. (L.) major* (LmRpa-1). Desta forma, para a amplificação do gene que codifica a proteína homóloga em *L. (L.) amazonensis* foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores a partir da sequência de nucleotídeos do gene *LmRpa-1* (contig LmjF28-07-20031115_V2.0, Projeto Genoma de *Leishmania*) como mostrado na Figura 18. Foram testados dois pares de iniciadores, o produto da amplificação do par formado pelos iniciadores 3 e 4 gerava um fragmento interno do gene (0,741 Kb) e o outro par formado pelos iniciadores 1 e 2 gerava um produto que continha provavelmente a sequência completa do gene (1,404 Kb). Para a obtenção desses fragmentos de DNA, foi necessário padronizar-se as condições de PCR (Figuras 30A e 30B), como descrito no item 4.12.3. Na Figura 30A, por exemplo, testou-se diferentes concentrações de MgCl₂ (1,5-4 mM) tanto para obtenção do fragmento de 0,741 kb quanto para a amplificação do fragmento contendo o gene *LaRpa-1*. As condições que permitiram a amplificação do fragmento interno do gene *LaRpa-1* incluíam 1,5 mM de MgSO₄, e 52 °C para temperatura de anelamento. Para a amplificação do

produto contendo a sequência integral do gene utilizou-se 0,75 mM de MgCl_2 e 55 °C para temperatura de anelamento. As condições ótimas referem-se às reações que apresentaram somente os produtos de tamanho esperado (~0,741 Kb e ~1,404 Kb).

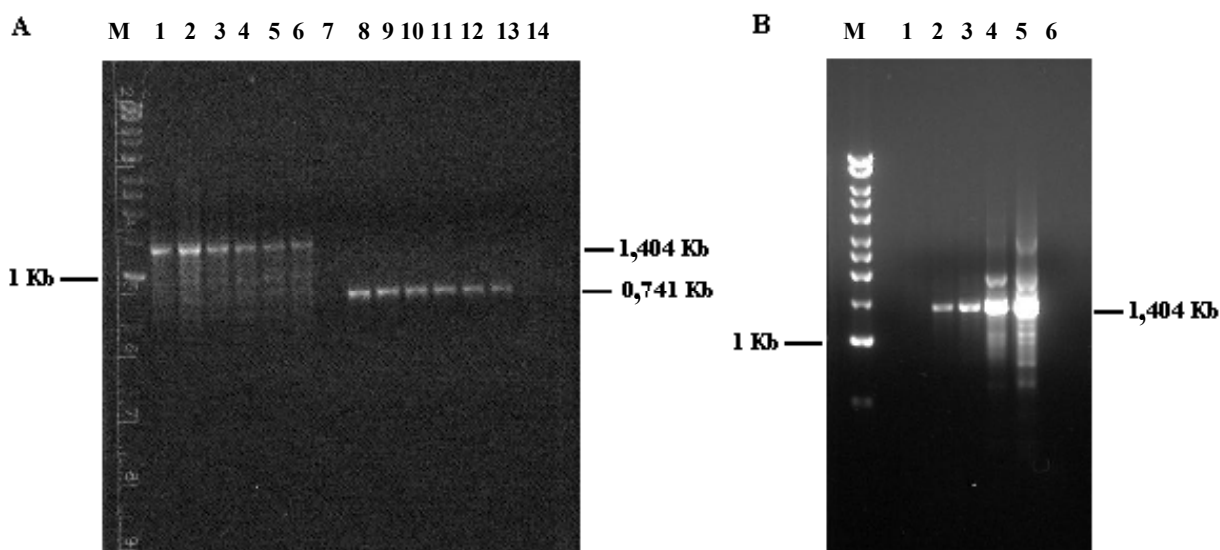


Figura 30. Padronização da amplificação por PCR dos fragmentos de DNA genômico contendo as sequências parcial e integral do gene *LaRpa-1*. Em A) e B) os produtos de PCR foram obtidos a partir de DNA genômico de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e fracionados em gel de agarose 0,8% (p/v) corado com brometo de etídio. **A)** Produtos da amplificação da sequência integral (linhas 1-6) e parcial (linhas 8-13) do gene *LaRpa-1* obtidos com os iniciadores 1-2 e 3-4, respectivamente, na presença de diferentes concentrações de MgCl_2 : 1,5 mM (linhas 1 e 8); 2 mM (linhas 2 e 9); 2,5 mM (linhas 3 e 10); 3 mM (linhas 4 e 11); 3,5 mM (linhas 5 e 12) e 4 mM (linhas 6 e 13). Linhas 7 e 14, reações realizadas na ausência de molde (DNA genômico). **B)** Amplificação de fragmento de DNA contendo a sequência integral do gene *LaRpa-1*. Como em A) as reações de PCR foram realizadas na presença de diferentes concentrações de MgCl_2 : 0,5 mM (linha 1); 0,75 mM (linha 2); 1 mM (linha 3); 1,25 mM (linha 4) e 1,5 mM (linha 5). Linha 6, reação realizada na ausência de molde (DNA genômico). Em A) e B) M, Marcador de tamanho molecular de DNA de 1 Kb (Amersham Biosciences).

Um produto de PCR de ~1,4 Kb, de tamanho igual ao obtido a partir de DNA genômico, foi amplificado a partir de cDNA na forma de dupla fita de *L. (L.) amazonensis* usando-se os iniciadores 1 e 2 mostrados na Figura 18 (Figura 31, linhas 1 e 2, respectivamente).

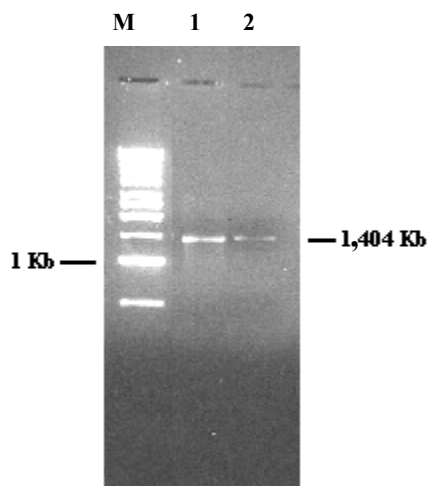


Figura 31. Amplificação do gene *LaRpa-1* a partir de DNA genômico e de cDNA de *L. (L.) amazonensis*. Produtos de amplificação obtidos com os iniciadores 1 e 2, foram fracionados em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídio. Linha 1, produto obtido da amplificação de DNA genômico, linha 2, produto obtido da amplificação de cDNA dupla fita. M, marcador de tamanho molecular de DNA de 1 Kb (Amersham Biosciences).

5.2.4.2. Análise da sequência do gene *LaRpa-1*

Inicialmente, os três produtos obtidos por PCR, ou seja fragmento contendo a sequência interna do gene e a sequência integral do gene amplificado a partir do DNA genômico e do cDNA dupla fita de *L. (L.) amazonensis*, foram seqüenciados utilizando-se os mesmos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para a amplificação por PCR (iniciadores 1-4, Figura 18). As seqüências foram comparadas entre si e com a seqüência do gene *LmRpa-1* utilizando-se os programas Blast2 e Clustal W (dados não mostrados). Uma vez confirmada a similaridade entre as seqüências amplificadas em *L. (L.) amazonensis* e a seqüência de *L. (L.) major*, procedeu-se à clonagem dos produtos de PCR obtidos a partir de DNA genômico e de cDNA em vetor de clonagem TOPO TA. Os DNAs obtidos dos plasmídeos recombinantes foram seqüenciados utilizando-se os iniciadores presentes no sítio de clonagem do vetor (M13 senso e antisense) e os iniciadores utilizados para amplificação por PCR.

As seqüências de nucleotídeos parciais e totais dos fragmentos de PCR clonados, assim como as seqüências traduzidas dos genes *LaRpa-1* e *LmRpa-1*, obtidas pelo programa Gene Runner, foram comparadas utilizando-se o programa Blast2. Os resultados mostram que essas seqüências apresentaram 97% de similaridade e 97% de identidade (Figura 32).

LaRpa-1:	MQQPGSHQIQPIDSLTPFLGGKWWIRARVTDKTDVRTWNKPTSQGKLFSFTLIDESAAIR 60
LmRpa-1	MQQPGSHQIQPIDSLTPFLGGKWWIRARVTDKTD+RTWNKPTSQGKLFSFTLIDESAAIR 60
LaRpa-1:	ATVFNDAVDTFEPLIVNGQVYYFSGGQVKANRRFSNVNNDYELTFDRSSEIMLARQDTS 120
LmRpa-1	ATVFNDAVDTFEPLIVNGQVYYFSGGQVKANRRFSNVNNDYELTFDRSSEIMLARQDTS 120
LaRpa-1:	TAALPMQRYNFVPIELLKQREVGSLVDVLGVVLKVDEVSSITQKSTGRELVKRNVKMGM 180
LmRpa-1	TAALPMQRYNFVPIELLKQREVGS�VDVLGVVLKVDEVSSITQKSTGREL+KRVNKMGM 180
LaRpa-1:	TAAVEVTFWNDEAKAWCYPVGTVALRQLKVGSHGVPFSSTYQTKIDINPTDLPDVKKL 240
LmRpa-1	TAAVEVTFWNDEAKAWCYPVGTVALRQLKVGSGV SSTYQTKIDINPTDLPDVKKL 240
LaRpa-1:	ATWYVTTGGANVMSLSSQGLGAASGAGGESDRGRKYLDEIQSDGIGRGLKPEYVDVRCVP 300
LmRpa-1	ATWYV TGGANV SLSSQGLGAASGAGGESDRGRKYLDEIQS+GIGRGLKPEYVDVRCVP 300
LaRpa-1:	IYFKQDAQWYDACPTCNKKVTEEGAQGDRFRCEKCDKTVTPTQRYLVSIQVTDNVSQAWL 360
LmRpa-1	IYFKQDAQWYDACPTCNKKVTEEGAQGDRFRCEKCDKTVTPTQRYLVSIQVTDNVSQAWL 360
LaRpa-1:	TLFNEAGIEFFGMEAAELKRAQEDPLYIAKLAQGRMNRPVVMRLRVKEETSSNAMTGEE 420
LmRpa-1	TLFNEAGIEFFGMEAAELKRAQEDPLYIAKLAQGRMNRPVVMRLRVKEE SSN+MTGEE 420
LaRpa-1:	SDRLRMSVVRISFEMPIAGTSEETRRRLAQNLRTCEILRLIEAYV 467
LmRpa-1	SDRLRMSVVRISFEMPIAGTSEETRRRLAQNLRTCEILRLIEAYV 467

Figura 32. Alinhamento entre as seqüências preditas de aminoácidos das proteínas LaRpa-1 e LmRpa-1 obtidos por Blast2. As seqüências apresentam 97% de identidade (457/467) e 97% de similaridade (457/467). Em vermelho os peptídeos da proteína LaRpa-1 seqüenciados por LC/ESI-MS/MS que compartilham 100% de identidade com as seqüências peptídicas de LmRpa-1 preditas.

Em seguida procedeu-se às análises comparativas entre a seqüência predita de aminoácidos de LaRpa-1 e outras proteínas Rpa-1 disponíveis nos bancos de dados públicos utilizando-se o programa Blastp. Também foram realizadas análises de alinhamento simples e múltiplo utilizando-se os programas Blast2 e Clustal W, respectivamente. Os resultados dos alinhamentos estão mostrados na Tabela 3. É possível observar que a seqüência predita de aminoácidos de LaRpa-1 compartilha alta identidade com as seqüências homólogas preditas de LmRpa-1 (97%), LiRpa-1 (97%) e CfRpa-1 (91%).

Tabela 3. Identities e similaridades entre a sequência predita de aminoácidos de LaRpa-1 e outras Rpa-1 disponíveis nos bancos de dados. Lm, *Leishmania major*; Li, *Leishmania infantum*; Cf, *Crithidia fasciculata*; Tb, *Trypanosoma brucei*; Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*; Xl, *Xenopus laevis*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Sp, *Schyzosaccharomyces pombe*; Dm, *Drosophila melanogaster*; At, *Arabidopsis thaliana*; Pf, *Plasmodium falciparum*; Cp, *Cryptosporidium parvum*

GENE	No. Acesso no Genebank	% Identidade com LaRpa-1	% Similaridade com LaRpa-1
<i>LmRpa-1</i>	LmjF28_07_20031115_V2.0 ^a	97	97
<i>LiRpa-1</i>	AF399823_1	97	97
<i>CfRpa-1</i>	Q23686	91	96
<i>TbRpa-1</i>	Tb11.01.0870 ^b	67	82
<i>HsRpa-1</i>	NP_002936.1	34	53
<i>MmRpa-1</i>	NP_080929.1	33	52
<i>XlRpa-1</i>	Q01588	32	52
<i>ScRpa-1</i>	P 22336	30	53
<i>SpRpa-1</i>	AAC49694.1	32	51
<i>DmRpa-1</i>	NP_524274.1	34	52
<i>AtRpa-1</i>	NP_567576.1	29	50
<i>PfRpa-1</i>	CAD51733.1	23	41
<i>CpRpa-1</i>	AF132307	24	42

^a contig encontrado no cromossomo 28 de *L. (L.) major*

^b contig encontrado no cromossomo 11 de *T. brucei*

5.2.4.3. Organização genômica e mapeamento cromossômico do gene *LaRpa-1*

A análise da organização genômica do gene *LaRpa-1* foi realizado por "Southern Blotting" hibridizando-se fragmentos de DNA de *L. (L.) amazonensis* digeridos com diferentes enzimas de restrição escolhidas com base no mapa de restrição gerado pelo programa Gene Runner, com sonda do gene *LaRpa-1* marcada radioativamente. O perfil de hibridização (Figura 33A), é característico de sequências que apresentam poucas cópias no genoma, pois um pequeno

número de fragmentos hibridizaram com a sonda (Figura 33A, linhas 1-9). Além disso, quando o DNA genômico é digerido com enzimas que não contêm sítios dentro do gene, tem-se a hibridização da sonda com um único fragmento (Figura 33A, linhas 6-9), sugerindo que o gene *LaRpa-1* deve estar presente em baixo número de cópias ou em cópia única no genoma do parasita.

Para o mapeamento cromossômico do gene *LaRpa-1*, "chromo-blots" foram hibridizados com o fragmento interno do gene obtido da amplificação por PCR (0,741 Kb) marcado por "random primer estension" com [α - 32 P]dGTP. Como marcadores utilizaram-se os cromossomos de *S. cerevisiae* e *Hansenula wingei*. A hibridização indica que o gene está localizado em uma banda cromossômica de ~0,8 Mb (Figura 33B).

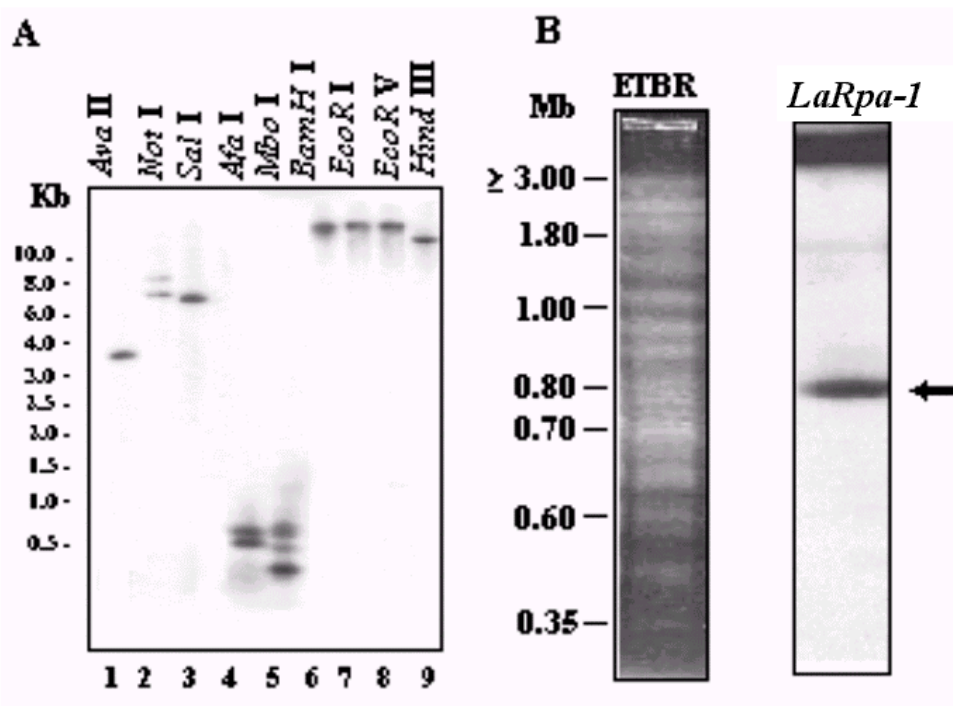


Figura 33. Organização genômica e mapeamento cromossômico do gene *LaRpa-1*. A) O DNA genômico de *L. (L.) amazonensis* foi digerido usando-se as enzimas de restrição *AvaII*, *NotI*, *SalI*, *AfaI*, *MboI*, *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV* e *HindIII*. O DNA digerido foi fracionado em gel de agarose 0,8% (p/v) em 0,5X TAE, desnaturado e transferido por capilaridade para membrana de nylon Hybond N+. A membrana foi hibridizada com o fragmento interno do gene *LaRpa-1* (0,741 Kb) marcado com [α - 32 P]dGTP e exposta em filme X-Omat. Utilizou-se o marcador de tamanho molecular de DNA de 1 Kb (Amersham Biosciences). B) Os cromossomos de *L. (L.) amazonensis* foram separados por PFGE utilizando-se condições de corrida que permitem a separação dos cromossomos da maioria dos parasitas em um único gel (Conte F. e Cano MI, dados não publicados). Os cromossomos foram transferidos por transferência alcalina para membrana de náilon Hybond N+ e hibridizados com a mesma sonda radioativa usada em A. Como marcadores utilizaram-se os cromossomos de *S. cerevisiae* e *Hansenula wingei*, para estimar o tamanho (Mb) das bandas cromossômicas como mostrado à esquerda no gel corado com brometo de etídio (ETBR).

6. DISCUSSÃO

6.1. Extratos de *L. (L.) amazonensis* possuem atividade de telomerase

Em muitos organismos, incluindo leveduras, humanos e os protozoários parasitas do gênero *Leishmania*, os telômeros são formados por DNA repetitivo nas formas de dupla fita e simples fita, sendo que a porção simples fita forma uma projeção rica em G no terminal 3' de cromossomos lineares [47, 63, 67]. Essa projeção terminal simples fita é muito importante porque serve de substrato para a replicação telomérica pela enzima telomerase e também para a associação de proteínas que são responsáveis pela proteção e regulação do tamanho dos telômeros, os quais têm um papel essencial na integridade do genoma e na viabilidade celular [44, 161]. Uma parte do DNA telomérico que é perdido em cada ciclo de replicação celular [71, 72] é preenchido primariamente pela ação da enzima telomerase, que adiciona dNTPs no terminal 3' da fita rica em G do DNA cromossomal, por transcrição reversa de um molde de sequência telomérica contido no componente intrínseco, a molécula de RNA da telomerase [79].

Os telômeros em Kinetoplastida, incluindo as diferentes espécies de *Leishmania*, são compostos por cópias repetidas em *tandem* de seqüências de 6 pb (5'-TTAGGG-3') [49], as quais também são encontradas nos telômeros de humanos [70]. E à semelhança de outros eucariotos, nesses protozoários os telômeros são replicados pela telomerase, a qual é encontrada ativa em extratos semipurificados de *T. brucei*, *L. (L.) major*, e *L. tarentolae* [65]. No presente trabalho, detectou-se atividade de telomerase em extratos protéicos S100 e nuclear de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* semipurificados por cromatografia de troca iônica em colunas de DEAE-agarose utilizando-se a variante "One Tube TRAP" do método TRAP (Figura 20A), com modificações do protocolo original descrito por Kim e col. [77]. Este protocolo de TRAP modificado [170] apresenta inúmeras vantagens sobre o original tais como: realizar as duas etapas de reação (reação de telomerase e PCR) em um tubo único e a utilização do oligonucleotídeo antisense ACX sem que haja ocorrência de produtos inespecíficos/artefatos no PCR. A atividade de telomerase em *L. (L.) amazonensis* descrita neste trabalho gerou produtos com periodicidade de 6 nt, consistente com a síntese da repetição telomérica 5'-TTAGGG-3', este padrão reflete que a telomerase de *L. (L.) amazonensis* apresenta as mesmas características das telomerases dos Kinetoplastida e de outros eucariotos [61].

A atividade da telomerase também foi detectada utilizando-se outra variante do método TRAP, ensaios do tipo "Two Tube TRAP" nas frações obtidas da cromatografia de troca iônica em colunas de DEAE-agarose dos extratos protéicos S100 e nuclear de *L. (L.) amazonensis* (Figura 20B) e após purificação do extrato S100 por cromatografia de afinidade (Figura 21). Aqui e como demonstrado anteriormente [65], os produtos visualizados nos autorradiogramas são muito mais intensos que os observados no ensaio "One Tube TRAP". Além disso, esse ensaio permite determinar a processividade da telomerase devido a sua alta sensibilidade, sendo possível neste trabalho visualizar produtos ≥ 116 pb com periodicidade de 6 nt (Figura 20B, linhas 4 e 5) utilizando-se só a metade da quantidade do extrato protéico utilizada no ensaio "One Tube TRAP".

A atividade de telomerase foi descrita pela primeira vez no protozoário ciliado *T. thermophila* [76], e tem sido descrita em diversos organismos eucariotos como por exemplo, leveduras, mamíferos, plantas e outros protozoários como *P. falciparum* [83-91, 177, 178]. Em humanos, a maioria das células somáticas não expressa atividade de telomerase, ao contrário do que ocorre em células germinativas e em algumas células em proliferação, como os componentes do sangue e do tecido da epiderme. A atividade desta enzima também é encontrada freqüentemente em linhagens celulares imortalizadas e na maioria das células tumorais [65, 77, 78]. *L. (L.) amazonensis* é um dos agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar americana no Brasil, doença que constitui um importante problema de saúde pública e para a qual ainda não existe um composto que apresente um bom índice terapêutico e uma baixa toxicidade. Por esse motivo é muito importante ter detectado atividade de telomerase nos extratos protéicos desse parasita, já que essa enzima pode ser um alvo eficaz para o desenvolvimento futuro de drogas ou outras terapias antiparasitárias.

6.2. Propriedades de interação dos complexos proteína-DNA de *L. (L.) amazonensis*: LaGTs

Neste trabalho, além da demonstração da atividade de telomerase em extratos protéicos de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, identificou-se três complexos formados por proteínas que se associam *in vitro* à fita telomérica rica em G. Estes complexos denominados LaGT1, LaGT2 e LaGT3 foram identificados por EMSA e "UV cross-linking" em frações eluídas da coluna de DEAE-agarose originadas de extratos protéicos S100 e nuclear (item 5.1). As

proteínas que formam esses complexos não se associam à fita rica em C nem ao DNA telomérico na forma de dupla fita, indicando que as mesmas têm preferência pela sequência telomérica rica em G. O complexo LaGT1 é o mais específico dos três e também interage com DNA telomérico contendo a projeção 3' terminal rica em G, uma característica compartilhada por outras proteínas que se associam ao DNA telomérico simples fita rico em G [135, 136]. Ao contrário, as atividades de interação das proteínas que formam os complexos LaGT2 e LaGT3 são menos específicas pois podem ser inibidas por alguns dos competidores não teloméricos estudados, sugerindo que elas podem se associar com uma variedade de sequências alvo ou reconhecer uma estrutura específica do DNA, à semelhança da subunidade β da proteína telomérica de *O. nova*, *OnTeb* [135]. Também e semelhantemente a outras proteínas teloméricas descritas em leveduras (Est1) [179], *Clamidomonas reinhardtii* (Gbp1) [180] e *T. brucei* (complexo C3) [155], as proteínas que formam os complexos LaGTs se associam com a sequência cognata na forma de RNA. Além disso, todos os complexos LaGTs assim como as proteínas que se associam aos telômeros de *Oxytricha* [135] são estáveis em altas concentrações de sal, sugerindo que esses complexos proteína–DNA telomérico podem ser mantidos por interações hidrofóbicas. Embora os tipos de contatos entre DNA e proteínas não possam ser generalizados, e cada exemplo tem suas características próprias, interações hidrofóbicas podem ter papel importante nas características que governam a associação de LaGT1 com a fita telomérica rica em G, já que esse complexo, diferentemente de LaGT2 e LaGT3 só é formado a 4 °C. Interações hidrofóbicas são favorecidas a baixas temperaturas contribuindo para a especificidade e a afinidade das associações [181].

Nas condições usadas nos experimentos mostrados neste trabalho (item 5.1), duas proteínas de 35 kDa e 52 kDa foram eluídas com alto grau de pureza na maioria das frações da coluna de cromatografia de afinidade. Experimentos de renaturação mostraram que estas proteínas continham respectivamente atividade de LaGT2 e LaGT3, sendo que nenhuma delas ou outras bandas protéicas purificadas por afinidade, mostraram atividade de LaGT1 após renaturação. A análise do espectro de massa (MALDI-TOF) e o sequenciamento (LC/ESI-MS/MS) da proteína de 35 kDa que apresenta atividade de LaGT2, demonstrou que ela compartilha similaridades com a sequência traduzida do clone CAB71224 encontrada no banco de dados do genoma de *L. (L.) major* (LmRbp38). Esta por sua vez é idêntica à proteína Rbp38 descrita por Scibicego e col. [156] como uma proteína conservada entre os kinetoplastida e cuja

função é estabilizar RNA mitocondrial. De acordo com esses autores, o gene que codifica a Rbp38 é nuclear em *L. tarentolae* (AAO39844) e em *T. brucei* (AAO39843) sendo que a proteína não apresenta nenhum motivo conhecido de interação com RNA. Rbp38 também apresenta 70% de identidade com Tc38, uma proteína de *T. cruzi* que se associa especificamente a motivos poly[dT-dG] presentes nas regiões intergênicas [182]. Segundo Duhagon e col. [182], Tc38 pode ter localização nuclear e mitocondrial. Interessantemente, a atividade de LaGT2 encontrada em extratos S100 e nuclear de *L. (L.) amazonensis*, associa-se à sequência telomérica rica em G na forma de DNA e RNA simples fita, apresentando alta afinidade por esse último. Por isso, será interessante verificar se a proteína LaRbp38 é bifuncional, ou seja se tem papel nuclear e mitocondrial e se estas possíveis funções poderão ser diferenciadas entre si. Coincidentemente, em *S. cerevisiae* a proteína Pif1 é uma helicase que apresenta formas mitocondrial e nuclear, sendo que a última coimunoprecipita com o DNA telomérico *in vivo* e inibe a atividade da telomerase [183].

A análise da sequência dos peptídeos trípticos de 1340.36 m/z e 1427.55 m/z da proteína de 52 kDa que tem atividade de LaGT3, revelou que essa proteína de *L. (L.) amazonensis* é homóloga à sequência putativa da subunidade 1 da proteína de replicação A (Rpa-1) de *L. (L.) infantum*, (AAK84867) e de *L. (L.) major* (contig LmjF28_07_20031115_V2.0), já que existe aproximadamente 100% de similaridade entre as sequências das três proteínas.

A caracterização adicional dos complexos LaGTs, demonstrou que LaGT1 se associa a fita telomérica rica em G independentemente da permutação no terminal 3' (Tabela 1 do item 5.1), e do tamanho das mesmas. LaGT1 é formado igualmente na presença de oligonucleotídeos de 18 mer (Tel1-Tel6), 30 mer (Tel30) e 36 mer (Tel36), mas não é formado com a fita telomérica rica em C, DNA telomérico na forma de dupla fita e muito menos com oligonucleotídeos contendo a sequência telomérica de outros organismos (Fernández e col. item 5.1 e Figura 25).

A constante de dissociação (K_d) estimada para o complexo LaGT1 com oligonucleotídeo de sequência telomérica rica em G na forma de DNA (Tel6), foi de 12,80 nM (Figura 26), valor este semelhante ao descrito para outras proteínas teloméricas [172]. Também os valores de K_d estimados para os complexos LaGT2 e LaGT3, tanto com oligonucleotídeos de sequência telomérica rica em G nas formas de DNA quanto de RNA, se encontram na faixa de nM (Figura 26) descrita para outras proteínas que se associam à fita telomérica rica em G [172]. Os valores

das K_d estimados para os complexos LaGT2 e LaGT3 com Tel6 e Tel6RNA sugerem que ambas proteínas se associam fortemente à sequência de RNA, similarmente às proteínas teloméricas Est1 de leveduras [118-119], Gbp1 de *C. reinhardtii* [180] e p80/p95 de *T. thermophila* [112].

Para explorar as propriedades de interação das proteínas que formam os complexos LaGT2 e LaGT3, utilizou-se espectroscopia de fluorescência (Figura 29 e Tabela 3). O estudo da fluorescência das proteínas é um método adequado para identificar a conformação das mesmas, baseado nos resíduos de triptofano. O triptofano (Trp) é um aminoácido que apresenta um centro fluoróforo que é sensível a ambientes polares como o que existe no interior de uma proteína. Quando os resíduos de Trp estão completamente expostos a água eles apresentam fluorescência máxima a 350 nm e quando estão completamente imersos no interior da proteína eles apresentam fluorescência máxima a 330 nm, por isso os resíduos de Trp são ideais para estudar a conformação de proteínas. Porém, às vezes a fluorescência do Trp pode variar. O rendimento quântico pode aumentar ou diminuir com o desdobramento da proteína. Também, a complexidade dos espectros de fluorescência pode aumentar com o número de resíduos aromáticos: resíduos de Trp e de Tirosina (Tyr), devido a possível transferência de energia. Desta forma, quando muitos resíduos de Tyr estão presentes, o comprimento de onda de excitação de 295 nm é escolhido em vez do 280 nm que é o mais habitual para abolir a influência deles nos espectros de fluorescência do Trp [184].

Os alinhamentos entre as seqüências preditas de aminoácidos de LaRpa-1 com LmRpa-1 (Figura 32) mostraram que LaRpa-1 contém oito resíduos de Trp localizados possivelmente dentro do domínio "OB fold" de ligação ao DNA. No ensaio mostrado na Figura 28, se observa um aumento da intensidade da fluorescência quando ocorre a interação entre o oligonucleotídeo Tel6 e a proteína LaRpa-1, embora o comprimento de onda máximo e o centro de massa não apresentaram modificações. Tal comportamento pode ser atribuído a vários motivos: i) alguns resíduos de Trp que estavam anteriormente expostos ficaram interiorizados quando da interação da proteína com o DNA telomérico (Tel6); ii) outros resíduos de Trp que estavam no interior da proteína passaram a experimentar um ambiente modificado durante a ligação a Tel6; iii) uma combinação dos fenômenos descritos em i e ii. Outras análises dessa interação proteína-DNA deverão ser testadas sob diferentes condições, como por exemplo, a modificação da temperatura utilizada durante o ensaio, quantidades maiores de proteína (por exemplo, utilizar proteína

recombinante ao invés de proteína nativa) e sondas diferentes. Isto será importante para definir ou interpretar com maior precisão os fenômenos mostrados.

6.3. Clonagem e caracterização do gene *LaRpa-1*

Na maioria dos eucariotos, a Rpa constitui um complexo protéico heterotrimérico estável que se liga com muita afinidade à simples fita de DNA. Em leveduras e humanos, como discutido adiante, parece que a subunidade 1 (Rpa-1) está envolvida em processos importantes da célula incluindo a manutenção dos telômeros [147]. Existem evidências que sugerem que Rpa-1 interfere diretamente com a homeostase telomérica [139, 150, 151]. Pela possível importância desta proteína nos telômeros de *Leishmania* spp., decidiu-se realizar a clonagem e caracterização do gene que codifica a proteína homóloga em *L. (L.) amazonensis*. Oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados a partir da sequência de nucleotídeos do gene *LmRpa-1* (contig LmjF28-07-20031115_V2.0, Projeto Genoma de *Leishmania*), os peptídeos da proteína LaRpa-1 sequenciados por LC/ESI-MS/MS (Figura 23) compartilham 100% de identidade com as sequências peptídicas preditas de LmRpa-1 (Figura 32). Fragmentos do gene *LaRpa-1* e a sequência integral foram amplificadas a partir de DNA genômico e a partir de cDNA dupla fita de *L. (L.) amazonensis*, indicando que esse gene é transcrito.

Os polipeptídeos anotados como Rpa-1 nos genomas de diferentes tripanosomatídeos têm tamanhos aparentes de 51 Kda, quando comparadas com as sequências de Rpa-1 descritas em outros eucariotos (por exemplo *H. sapiens* e *S. cerevisiae*) e mostram ausência do domínio N-terminal que não participa da ligação ao DNA, mas na maioria dos eucariotos está envolvido nas interações de Rpa com outras proteínas [185-187]. Porém, analisando-se os domínios conservados na sequência predita das proteínas LaRpa-1 (AY493356), LiRpa-1 (AAK84867) e LmRpa-1 (contig LmjF28_07_20031115_V2.0), pelo programa RPS-BLAST ("Reverse Position Specific BLAST": www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi), foi possível identificar a existência de um domínio estrutural do tipo "OB fold" (98% de similaridade) na porção N-terminal das mesmas (aminoácidos 23-104). É interessante notar que as proteínas que se associam à fita telomérica rica em G e que protegem os terminais dos cromossomos de protozoários ciliados (Tebp de *O. nova* e *E. crassus*) [135, 188], humanos (hPot 1) [136] e leveduras (Cdc13) [138], compartilham com as Rpa-1 os motivos estruturais de ligação a ácidos

nucléicos do tipo "OB folds". Portanto, na ausência de estudos *in vivo* não se pode excluir a possibilidade de que LaRpa-1, assim como as outras Rpa-1 preditas em tripanosomatídeos sejam novas proteínas relacionadas a uma superfamília de proteínas teloméricas que possuem domínios estruturais do tipo "OB fold". As proteínas que contêm esse motivo têm sido identificadas e amplamente estudadas pela sua importância na replicação, recombinação e reparo do DNA, transcrição, tradução, resposta a choque frio e manutenção telomérica. Esses domínios têm tamanho aproximado de 70-150 aminoácidos e embora não exista forte relação entre as seqüências dos diferentes membros desta superfamília de proteínas, este domínio é facilmente reconhecido em base a sua topologia peculiar [189].

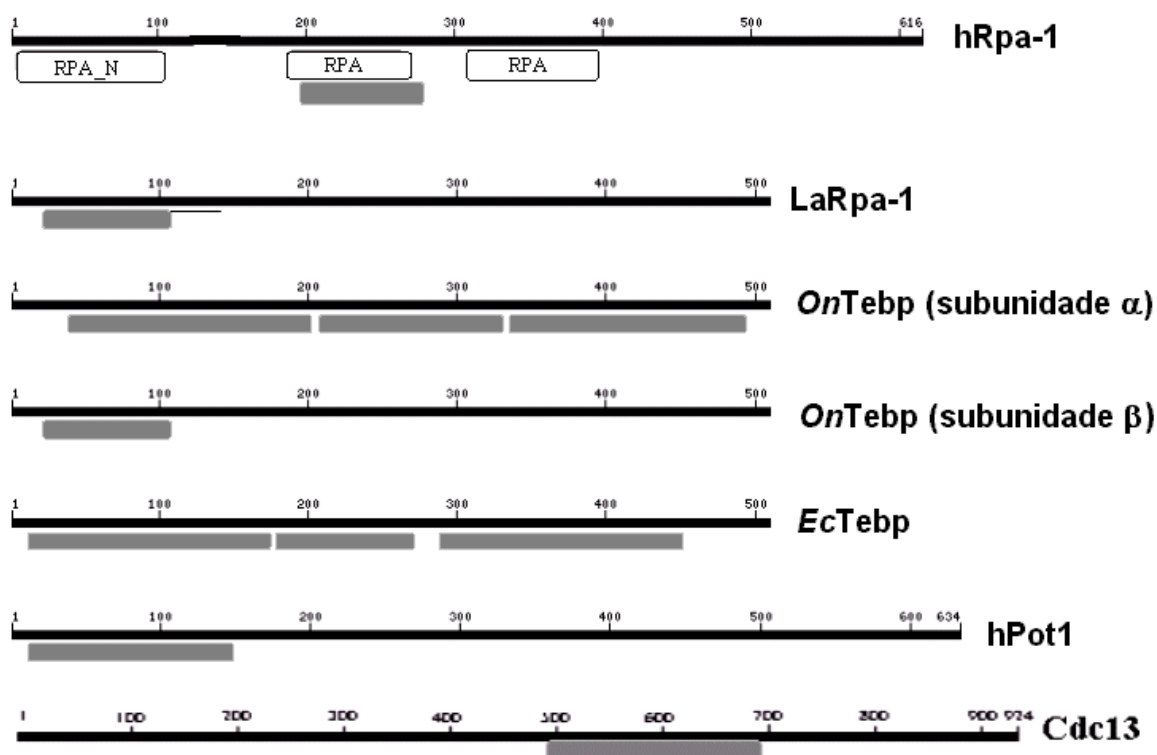


Figura 34. Posição dos motivos de associação ao DNA do tipo "OB-fold" nas proteínas Rpa-1 e nas proteínas que se associam à fita telomérica rica em G . A proteína hRpa-1 (NP002936) está representando todas as outras Rpa-1 já descritas em eucariotos. Os motivos do tipo "OB fold" (retângulos em cinza) estão localizados na região N-terminal de todas as Rpa-1 de parasitas kinetoplastídeos incluindo LaRpa-1 (AY493356) e de as proteínas teloméricas *OnTebp* subunidade β (OTCB) e hPot1 (Q9NUX5). *OnTebp* subunidade α (KIXA) e *EcTebp* (Q06184) apresentam três motivos do tipo "OB fold". Em hRpa-1 além do motivo "OB fold", existem também motivos de Rpa de eucariotos conservados, um dos quais está localizado na região N-terminal (RPA_N). Na proteína Cdc13 (NP010061) de *S. cerevisiae* o motivo "OB fold" está localizado quase centralmente na proteína (aminoácidos 497-694). O diagrama não está em escala e os números que aparecem nas linhas em preto são para ajudar na localização dos domínios em cada polipeptídeo. h, humanos; La, *L.(L.) amazonensis*; On, *Oxytricha nova*; Ec, *Euplotes crassus*.

6.4. Considerações sobre as metodologias usadas neste trabalho para a identificação das proteínas teloméricas de *L. (L.) amazonensis*.

A identificação de proteínas isoladas das células depende da concentração das mesmas e da sua estabilidade. De forma geral é conhecido que existem dificuldades na purificação de proteínas que se associam a uma sequência específica de DNA devido a sua baixa representatividade nas células, mas isso é possível utilizando-se a cromatografia de afinidade, o qual é um método potente e de alta especificidade [190]. A combinação dessa especificidade da cromatografia de afinidade com a sensibilidade da identificação de proteínas por espectrometria de massa constitui um grande sucesso [191].

Com o desenvolvimento de métodos de ionização, a espectrometria de massa (EM) começou a ganhar importância. Atualmente a chave para a identificação de proteínas está baseada na associação de vários elementos dentro dos quais a EM tem um papel importante, constituindo uma ferramenta indispensável, junto com outros elementos como a disponibilidade de sequências genômicas completas, de outros bancos de dados de sequências, e o desenvolvimento de programas computacionais que permitem correlacionar os dados obtidos por EM com os dados disponíveis nos bancos de dados de sequências [192, 193]. Os métodos de EM mais comumente utilizados são: "matrix assisted laser desorption ionization" (MALDI) "time of flight" (TOF) e a EM em *tandem* por ionização eletro-"spray" acoplada a cromatografia líquida: "liquid chromatography (LC) electrospray ionization (ESI) tandem mass spectrometry (MS/MS)". Em ambos métodos as identidades das proteínas são determinadas por comparação dos dados obtidos experimentalmente com os dados disponíveis nos bancos de dados de sequências, embora o método MS/MS também permite a determinação das sequências de peptídeos a partir do espectro de dissociação induzido por colisão [192]. Quando comparada com outras técnicas de identificação de proteínas, como o sequenciamento por degradação de EDMAN e a identificação pela composição de aminoácidos, a EM tem vantagens por ser mais rápida e apresentar maior sensibilidade [192].

Um dos objetivos fundamentais deste trabalho foi a purificação e identificação de proteínas que formam parte do complexo telomérico de *L. (L.) amazonensis*. Para identificar as proteínas que formam os complexos LaGT2 e LaGT3, elas foram purificadas por cromatografia de afinidade (item 5.1), fracionadas em géis, coradas, cortadas, retiradas dos mesmos e digeridas em gel com tripsina. Para a identificação da proteína que forma o complexo LaGT1, este

complexo foi irradiado *in situ* com luz UV após ensaio de EMSA, cortado, retirado e eluído do gel. Posteriormente este complexo foi aplicado em um gel de proteínas para separar possíveis comigrantes (item 5.1). O gel foi corado, e a banda correspondente ao complexo foi cortada, retirada do gel e digerida em gel com tripsina. Os peptídeos trípticos obtidos pela digestão enzimática das três proteínas foram analisados por EM utilizando-se primeiramente a técnica de MALDI-TOF e posteriormente o sequenciamento por LC/ESI-MS/MS (item 5.1). Os dados de sequenciamento dos peptídeos trípticos confirmaram os resultados obtidos por MALDI-TOF, a proteína LaRbp38 forma o complexo LaGT2 e a proteína LaRpa-1 forma o complexo LaGT3. Foi possível identificar dez peptídeos pertencentes a LaRbp38 (Figura 22) e dois peptídeos pertencentes a LaRpa-1 (Figura 23) com coberturas nas seqüências de aminoácidos das respectivas proteínas de 34,48% e 5,56% (Figura 24A e 24B). Embora a porcentagem de cobertura das seqüências de dois peptídeos no caso da proteína LaRpa-1 seja baixa, isto não invalidou a análise, já que com as técnicas de MS/MS é possível a identificação de uma proteína pelo sequenciamento de um único peptídeo [193].

No caso do complexo LaGT1 (~18-20 kDa) não foi possível a dissociação dos peptídeos trípticos por colisão devido provavelmente a pouca quantidade de proteína na amostra ou ao efeito que a irradiação com luz UV pode ter provocado sobre o complexo, mas a análise do espectro de massa dos peptídeos trípticos obtidos por MALDI-TOF e LC/ESI-MS/MS foram similares e revelaram que o componente protéico de ≤ 15 kDa não tem homólogos nas bases de dados de proteínas. As análises por ESI-MS/MS dos complexos proteína-DNA associados covalentemente pode ser difícil, já que os dois componentes possuem dificuldades para a ionização. O uso combinado de análogos de bases foto-ativáveis, como o 5-IdU, e protocolos de ESI-MS/MS apropriados poderão auxiliar na caracterização e identificação do componente protéico do complexo LaGT1 [78].

Ensaio estão em andamento no laboratório (tese de doutorado do aluno Jair Lage de Siqueira Neto) para descobrir-se a função das proteínas que formam os complexos LaGT2 e LaGT3 de *L. (L.) amazonensis* identificadas neste trabalho (LaRbp-38 e LaRpa-1, respectivamente), assim como a identificação da proteína que forma o complexo LaGT1. O possível papel dessas proteínas na regulação e proteção dos telômeros de *Leishmania* spp. deve ser futuramente elucidado.

A composição da cromatina telomérica dos tripanosomatídeos é pouco conhecida e especificamente em *Leishmania* spp. antes da realização deste projeto, não existia nenhum trabalho que descrevesse a identificação de proteínas que se associam aos telômeros desses parasitas. Este trabalho é original e contribui para elucidar parcialmente a estrutura da cromatina telomérica de *L. (L.) amazonensis* *in vitro*.



Figura 35. Representação esquemática da cromatina telomérica de *L. (L.) amazonensis*. Além da telomerase (TERT) duas proteínas se associam pelo menos *in vitro* à fita telomérica rica em G desse parasita: LaRbp38 e LaRpa-1. O círculo amarelo representa a proteína que forma parte do complexo LaGT1 que ainda não foi identificada.

7. CONCLUSÕES

O presente trabalho de tese tinha como objetivo fundamental a identificação de componentes da cromatina telomérica de *L. (L.) amazonensis*, não descritos na literatura, e que poderiam ajudar-nos a descobrir a organização nucleoprotéica dos terminais dos cromossomos do parasita. Durante o período de desenvolvimento do mesmo foram obtidos resultados que estão mostrados em um manuscrito publicado no periódico *European Journal of Biochemistry* e no item de Resultados Complementares. Fazendo uma análise desses resultados podemos concluir, de forma geral, que:

1. Os extratos S100 e nuclear de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* apresentam atividade de telomerase, o qual é muito importante já que esta enzima poderia ser futuramente um alvo eficaz para o desenvolvimento futuro de drogas ou outras terapias anti- *L. (L.) amazonensis*, um dos parasitas que causam leishmaniose tegumentar americana no Brasil. A leishmaniose é um importante problema de saúde pública e para a qual ainda não existe um composto que apresente um bom índice terapêutico e baixa toxicidade.
2. Além da atividade da telomerase foram identificados três complexos proteína-DNA: LaGT1-LaGT3 que se associam *in vitro* com a simples fita de DNA telomérico rica em G de *L. (L.) amazonensis*, e essas associações são estáveis a altas concentrações de sais. Nenhum dos complexos se associa a DNA telomérico na forma de dupla fita nem com a fita rica em C.
3. O complexo LaGT1 é o mais abundante e específico para a fita telomérica rica em G, sendo formado com todos os oligonucleotídeos de sequência telomérica Tel1 a Tel6, independentemente de eles conterem terminais 3' permutados por um único nucleotídeo, como também com oligonucleotídeos de sequência telomérica de 30 nt (Tel30) e 36 nt (Tel36), não assim com oligonucleotídeos contendo a sequência telomérica de outros organismos.
4. As constantes de dissociação (K_d) estimadas para o complexo LaGT1 com sequência de DNA telomérico e para os complexos LaGT2 e LaGT3 com sequências de DNA e RNA teloméricas estão na faixa de nM, como descrito para outras proteínas que se associam a simples fita de DNA. Os valores dos K_d estimados para os complexos LaGT2 e LaGT3

com Tel6 e Tel6RNA sugerem que ambas proteínas se associam fortemente à sequência cognata na forma de RNA.

5. As proteínas que compõem os complexos LaGT2 e LaGT3 foram purificadas por cromatografia de afinidade e após análise por espectrometria de massa demonstrou-se que o componente de ~35 kDa de LaGT2 é homólogo da proteína Rbp38 de *Leishmania* spp., enquanto o componente protéico de ~52 kDa de LaGT3 é similar à subunidade 1 da proteína de replicação A (Rpa-1) de *Leishmania* spp. O componente protéico de ≤ 15 kDa de LaGT1 provavelmente é uma proteína de *Leishmania* que ainda não foi identificada.
6. O gene que codifica o componente protéico do complexo LaGT3 (*LaRpa-1*) foi clonado e caracterizado devido à importância já demonstrada da proteína Rpa na manutenção dos telômeros de outros organismos. A análise da sua organização genômica demonstrou que o mesmo encontra-se provavelmente em baixo número de cópias ou em cópia única no genoma do parasita e que está localizado em uma banda cromossômica de ~0,8 Mb. O papel da proteína LaRpa-1, na manutenção e/ou proteção dos telômeros de *L. (L.) amazonensis*, deve ser ainda determinado.
7. A análise conformacional parcial da interação entre a proteína nativa renaturada LaRpa-1 e o DNA telomérico rico em G de *L. (L.) amazonensis* (oligonucleotídeo Tel6) realizada por espectroscopia de fluorescência mostrou um aumento da intensidade da fluorescência quando ocorre essa interação, mas futuramente essas análises deverão ser realizadas sob diferentes condições para poder interpretar com maior precisão os fenômenos mostrados neste trabalho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Neves, D. P., de Melo, A. L., Genaro, O. & Linardi, P. M. *Parasitologia humana*. 10^a edição, 2000, ed. Atheneu, p. 31-72.
2. Rey, L. *Parasitologia*. 3^a edição, 2001, ed. Guanabara Koogan S. A., p. 214-266.
3. Maslov, D. A. & Simpson L. (1995) Evolution of Parasitism in Kinetoplastida Protozoa. *Parasitol. Today*, **11**: 30-32.
4. Gossage, S. M., Rogers, M. E. & Bates, P. A. (2003) Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int. J. Parasitol.*, **33**: 1027-1034.
5. Sacks, D. & Noben-Trauth, N. (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Rev.Immunol.*, **2**: 845-858.
6. Ebert, F. (1973) Characterization of *Leishmania donovani* strains by disc electrophoresis. *Z. Tropenmed. Parasitol.*, **24**: 517-524.
7. Chance M. L., Peters W. & Shchory, L. (1974) Biochemical taxonomy of *Leishmania*. I. Observations on DNA. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **68**: 307-316.
8. Mahboudi, F., Abolhassani, M., Tehrani S. R., Azimi, M. & Asmar, M. (2002) Differentiation of old and new world *Leishmania* species at complex and species levels by PCR. *Scand J. Infect. Dis.*, **34**: 756-758.
9. Fernandes, O., Murthy, V. K., Kurath, U., Degraeve, W. M. & Campbell, D. A. (1994) Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **66**: 261-271.
10. Harris, E., Kropp, G., Belli, A., Rodriguez, B. & Agabian, N. (1998) Single-Step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J. Clin. Microbiol.*, **36**: 1989-1995.
11. Marfurt, J., Nasereddin, A., Niederwieser, I., Jaffe, C. L., Beck, H-P. & Felger, I. (2003) Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **41**: 3147-3153.

12. Marfurt, J., Niederwieser, I., Makia, N. D., Beck, H-P. & Felger, I. (2003) Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diagnostic Microbiol. Infect. Dis.*, **46**: 115-124.
13. Botero, D. & Restrepo, M. *Parasitosis humanas*. 2ª edição, 1994, ed. CIB, p. 213-230.
14. Berman, J. D. (1997) Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic and Chemotherapeutic Developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.*, **24**: 684-703.
15. Soto, J., Arana, B. A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J. C., Diaz, A., Luz, M., Gutierrez, P., Arboleda, M., Berman, J. D., Junge, K., Engel, J. & Sindermann, H. (2004) Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. *CID*, **38**: 1266-1272.
16. Handman, E. (1997) *Leishmania* vaccines: Old and New. *Parasitol. Today*, **13**: 236-238.
17. Requena, J. M., Iborra, S., Carrión, J., Alonso, C. & Soto, M. (2004) Recent advances in vaccines for leishmaniasis. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **4**: 1505-1517.
18. Huber, M., Timms, E., Mak, T. W., Rollinghoff, M. & Lohoff, M. (1998) Effective and long-lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice. *Infect. Immun.*, **66**: 3968-3970.
19. Locksley, R. M., Reiner, S. L., Hatam, F., Littman, D. R. & Killeen, N. (1993) Helper T cells without CD4: control of *Leishmaniasis* in CD4-deficient mice. *Science*, **261**: 1448-1451.
20. Rodrigues, M. M., Boscardin, S. B., Vasconcelos, J. R., Hiyane, M. I., Salay, G. & Soares I. S. (2003) Importance of CD8 T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for the development of effective vaccines. *Na. Acad. Bras. Cienc.*, **75**: 443-468.
21. Belkaid, Y., von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S. & UdeyMCand Sacks, D. (2002) CD8+T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J. Immunol.*, **168**: 3992-4000.
22. De Luca, P. M., Mayrink, W., Lves, C. R., Coutinho, S. G., Oliveira, M. P., Bertho, A. L., Toledo, V. P., Costa, C. A., Genaro, O. & Mendonca, S. C. (1999) Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary *Leishmaniasis*. *Vaccine*, **17**: 1179-1185.

23. Bottrel, R. L., Dutra, W. O., Martins, F. A., Gontijo, B., Carvalho, E., Barral-Netto, M., Barral, A., Almeida, R. P., Mayrink, W., Locksley, R. & Gollob, K. J. (2001) Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous *Leishmaniasis*. *Infect. Immun.*, **69**: 3232-3239.
24. Pompeu, M. M., Brodskyn, C., Teixeira, M. J., Clarencio, J., van Weyenberg, J., Coelho, I. C., Cardoso, S. A., Barral, A. & Barral-Netto, M. (2001) Differences in gamma interferon production *in vitro* predict the pace of the *in vivo* response to *Leishmania amazonensis* in healthy volunteers. *Infect. Immun.*, **69**: 7453-7460.
25. Brodskyn, C. I., Barral, A., Boaventura, V., Carvalho, E. & Barral-Netto, M. (1997) Parasite-driven *in vitro* human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal *Leishmaniasis*. *J. Immunol.*, **159**: 4467-4473.
26. Gurunathan, S., Sacks, D. L., Brown, D. R., Reiner, S. L., Charest, H., Glaichenhaus, N. & Seder, R. A. (1997) Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.*, **186**: 1137-1147.
27. Gurunathan, S., Stobie, L., Prussin, C., Sacks, D. L., Glaichenhaus, N., Iwasaki, A., Fowell, D. J., Locksley, R. M., Chang, J. T., Wu, C. Y. & Seder, R. A. (2000) Requirements for the maintenance of Th1 immunity *in vivo* following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8⁺ T cells. *J. Immunol.*, **165**: 915-924.
28. Wirth, D. (1990) Molecular Biology of *Leishmania*. In: *Modern Parasite Biology*, eds. Wyler, D., Freeman, W. H. Co. New York. p. 348-361.
29. Johnston, D., Blaxter, M., Degraeve, W., Foster, J., Ivens, A., Melville, S. (1999). Genomics and the biology of parasites. *Bioessays*, **21**: 131-147.
30. 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.
31. Alonso, G., Guevara, P. & Ramirez, J. L. (1992) Trypanosomatidae codon usage and GC distribution. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **87**: 517-523.

32. Bastien, P., Blaineau, C. & Pages, M. (1992) Molecular karyotype analysis in *Leishmania*. In: *Subcellular Biochemistry*, Vol. 18: *Intracellular parasites*, eds. Avila J. L. & Harris, J. R., p. 131-187. New York: Plenum press.
33. Rossi, V., Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M. & Bastien, P. (1994) Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **65**: 271-282.
34. Beverly, S. M. (1991) Genes amplification in *Leishmania*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**: 417-444.
35. Segovia, M. (1994) *Leishmania* genes amplification: a mechanism of drug resistance. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **88**: 123-130.
36. Tripp, C. A., Myler, P. J., Stuart, K. (1991) A DNA sequence (LD1) which occurs in several genomic organizations in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **47**: 151-156.
37. Segovia, M. & Ortiz, G. (1997) LD1 amplification in *Leishmania*. *Parasitol. Today*, **13**: 342-348.
38. Myler, P. J., Sisk, E., McDonagh, P. D., Martinez-Calvillo, S., Schnauffer, A., Sunkin, S. M., Yan, S., Madhubala, R., Ivens, A., Stuart, K. (2000) Genomic organization and gene function in *Leishmania*. *Biochem. Soc. Trans.*, **28**: 527-531.
39. Lanzer, M., Fischer, K. & Le Blancq, S. (1995) Parasitism and chromosome dynamics in protozoa parasites: is there a connection? *Mol. Biochem. Parasitol.*, **70**: 1-8.
40. 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 Acids Res.*, **24**: 1688-1694.
41. Zakian, V. (1995) Telomeres: beginning to understand the end. *Science*, **270**: 1601-1606.
42. Pryde, F., Gorham, H., Louis, E. (1997) Chromosome ends: all the same under their caps. *Curr. Op. Gen. Dev.*, **7**: 822- 828.
43. Blackburn, E. H. (2000) Telomere states and cell fates. *Nature*, **408**: 53-56.
44. Blackburn, E. H. (2002) Switching and Signaling at the Telomeres. *Cell*, **106**: 661-673.
45. Cooper, J. P. (2000) Telomere transitions in yeast: the end of the chromosome as we know it. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**: 169-177.

46. McEachern, M. J., Krauskopf, A. & Blackburn, E. H. (2000) Telomeres and Their Control. *Annu. Rev. Genet.*, **34**: 331–358.
47. Henderson, E. & Blackburn, E. H. (1989) An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol. Cell. Biol.*, **9**: 345-348.
48. Henderson, E. (1995) Telomere DNA Structure. In: *Telomeres*, Blackburn, E. & Greider, C. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 11-34.
49. Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H. & de Lange, T. (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, **97**: 503-514.
50. Muñoz-Jordan, J. L., Cross, G. A. M., de Lange, T. & Griffith, J. D. (2001) t-loops at trypanosome telomeres. *EMBO J*, **20** : 579-588.
51. Ponzi, M., Pace, T., Dore, E., Frontali, C. (1985) Identification of a telomeric DNA sequence in *Plasmodium berghei*. *EMBO J*, **4**: 2991-2995.
52. Vernick, K. D., Walliker, D., McCutchan, T. F. (1988) Genetic hypervariability of telomere-related sequences is associated with meiosis in *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res.*, **16**: 6973-6985.
53. del Portillo, H. A., Fernandez-Becerra, C., Bowman, S., Oliver, K., Preuss, M., Sanchez, C. P., Schneider, N. K., Villalobos, J. M., Rajandream, M. A., Harris, D. *et al.* (2001) A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. *Nature*, **410**: 839-842.
54. Scherf, A., Figueiredo, L. M. & Freitas-Junior, L. H. (2001) *Plasmodium* telomeres: a pathogen's perspective. *Curr. Opin. Microbiol.*, **4**: 409–414.
55. Figueiredo, L. M., Pirrit, L. A., Scherf, A. (2000) Genomic organisation and chromatin structure of *Plasmodium falciparum* chromosome ends. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **106**: 169-174.
56. Wright, J. H., Gottschling, D. E., Zakian, V. A. (1992) *Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes Dev.*, **6**: 197-210.
57. Tommerup, H., Dousmanis, A., de Lange, T. (1994) Unusual chromatin in human telomeres. *Mol. Cell. Biol.*, **14**: 5777-5785.
58. Freitas-Junior, L. H., Porto, R. M., Pirrit, L. A., Schenkman, S., Scherf, A. (1999) Identification of the telomere in *Trypanosoma cruzi* reveals highly heterogeneous telomere lengths in different parasite strains. *Nucleic Acids Res.*, **27**: 2451-2456.

59. Gardner, M. J., Tettelin, H., Carucci, D. J., Cummings, L. M., Aravind, L., Koonin, E. V., Shallom, S., Mason, T., Yu, K., Fujii, C. *et al.* (1998) Chromosome 2 sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, **282**: 1126-1132.
60. Bowman, S., Lawson, D., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Churcher, C. M. (1999) The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **400**: 532-538.
61. Cano, M. I. N. (2001) Telomere biology of Trypanosomatids: more questions than answers. *Trends in Parasitol.*, **17**: 425-429.
62. Rudenko, G. (2000) The polymorphic telomeres of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Biochem. Soc. Trans.*, **28**: 536-540.
63. Chiurillo, 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.
64. Freitas-Junior, L., Porto, R., Pirrit, L., Schenkman, S., Scherf, A. (1999) Identification of the telomere in *Trypanosoma cruzi* reveals highly heterogeneous telomere lengths in different parasite strains. *Nucleic Acids Res.*, **27**: 2451-2456.
65. Cano, M. I. N., Dungan, J., Agabian, N., Blackburn, E. H. (1999) Telomerase in Kinetoplastid Parasitic Protozoa.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 3616-3621.
66. O'Reilly, M., Teichman, S. A. & Rhodes, D. (1999) Telomerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**: 56-65.
67. Fu, G. & Barker, D. (1998) Characterisation of *Leishmania* telomeres reveals unusual telomeric repeats and conserved telomere-associated sequence. *Nucleic Acids Res.*, **26**: 2161-2167.
68. Chiurillo, J. M., Beck, A. E., Devos, T., Myler, P. J., Stuart, K. & Ramirez, J. L. (2000) Cloning and Characterization of *Leishmania donovani* Telomeres. *Exp. Parasitol.*, **94**: 248-258.
69. Pedrosa, A., Ruiz, J., Tosi, L. R. & Cruz, A. K. (2001) Characterization of three chromosomal ends of *Leishmania major* reveals transcriptional activity across arrays of reiterated and unique sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **114**: 71-80.
70. Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Daven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L. & Wu, J. R. (1988) A highly conserved repetitive DNA

- sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 6622-6626.
71. Watson, J. D. (1972) Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat. New. Biol.*, **239**: 197-201.
72. Olovnikov, A. M. (1973) A theory of marginotomy. *J. Theor. Biol.* **41**: 181-190.
73. Biessmann, H. & Mason, J. M. (1997) Telomere maintenance without telomerase. *Chromosoma*, **106**: 63-69.
74. Bryan, T. M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M. A., Reddel, R. R. (1997) Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat. Med.*, **3**: 1271-1274.
75. Bryan, T. M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., Reddel, R. R. (1995) Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.*, **14**: 4240-4248.
76. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extract. *Cell*, **43**: 405-413.
77. Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L. & Shay, J. W. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, **266**: 2011-2015.
78. Shay, J. W. & Bacchetti, S. (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer*, **33**: 787-791.
79. Nugent, C. & Lundblad, V. (1998) The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev.*, **12**: 1073-1085.
80. Greider C. W. & Blackburn E. H. (1989) A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, **337**: 331-337.
81. Cech, T. R. (2004) Beginning to understand the end of the chromosome. *Cell*, **116**: 273-279.
82. Lingner, J., Hughes, T. R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V. & Cech, T. R.. (1997) Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*, **276**: 561-567.

83. Lendvay, T. S., Morris, D. K., Sah, J., Balasubramanian, B. & Lundblad, V. (1996) Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics*, **144**: 1399–1412.
84. Harrington, L., Zhou, W., McPhail, T., Oulton, R., Yeung, D. S., Mar, V., Bass, M. B. & Robinson, M. O. (1997) Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev.*, **11**: 3109–3115.
85. Kilian, A., Bowtell, D. D., Abud, H. E., Hime, G. R., Venter, D. J., Keese, P. K., Duncan, E. L., Reddel, R. R. & Jefferson, R. A.. (1997) Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum. Mol. Genet.*, **6**: 2011–2019.
86. Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Harley, C. B. & Cech, T. R. (1997) Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*, **277**: 955–959.
87. Greenberg, R. A., Allsopp, R. C., Chin, L., Morin, G. B. & De, R. A. (1998) Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene*, **16**: 1723–1730.
88. Counter, C. M., Meyerson, M., Eaton, E. N. & Weinberg, R. A. (1997) The catalytic subunit of yeast telomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 9202–9207.
89. Bryan, T. M., Sperger, J. M., Chapman, K. B. & Cech, T. R. (1998) Telomerase reverse transcriptase genes identified in *Tetrahymena thermophila* and *Oxytricha trifallax*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 8479–8484.
90. Malik, H. S., Burke, W. D. & Eickbush, T. H. (2000) Putative telomerase catalytic subunits from *Giardia lamblia* and *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, **251**: 101–108.
91. Oguchi, K., Liu, H., Tamura, K. & Takahashi, H. (1999) Molecular cloning and characterization of AtTERT, a telomerase reverse transcriptase homolog in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, **457**: 465–469.
92. Nakamura, T. M. & Cech, T. R. (1998) Reversing time: origin of telomerase. *Cell*, **92**: 587–590.
93. Bryan, T. M., Goodrich, K. J., Cech, T. R. (2003) *Tetrahymena* telomerase is active as a monomer. *Mol. Biol. Cell.*, **14**: 4794–804

94. Lingner, J. & Cech, T. R. (1996) Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 10712-10717.
95. Aigner, S., Postberg, J., Lipps, H. J. & Cech, T. R. (2003) The *Euplotes* La motif protein p43 has properties of a telomerase-specific subunit. *Biochemistry*, **42**: 5736-5747.
96. Prescott, J. & Blackburn, E. H. (1997) Functionally interacting telomerase RNAs in the yeast telomerase complex. *Genes Dev.*, **11**: 2790-2800.
97. Moriarty, T. J., Huard, S., Dupuis, S. & Autexier, Ch. (2002) Functional multimerization of human telomerase requires an RNA interaction domain in the N terminus of the catalytic subunit. *Mol. Cell. Biol.*, **22**: 1253-1265.
98. Beattie, T., Zhou, W., Robinson, M. & Harrington, L. (2001) Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase. *Mol. Cell. Biol.*, **21**: 6151-6160.
99. Wenz, C., Enenkel, B., Amacker, M., Kelleher, C., Damm, K. & Lingner, J. (2001) Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules. *EMBO J.*, **20**: 3526-3534.
100. Chen, J. L., Blasco, M. A. & Greider, C. W. (2000) Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell*, **100**: 503-514.
101. Lingner, J., Hendrick, L. L. & Cech, T. R. (1994) Telomerase RNAs of different ciliates have a common secondary structure and a permuted template. *Genes Dev.*, **8**: 1984-1998.
102. Romero, D. P. & Blackburn, E. H. (1991) A conserved secondary structure for telomerase RNA. *Cell*, **67**: 343-353.
103. Gilley, D. & Blackburn, E. H. (1999) The telomerase RNA pseudoknot is critical for the stable assembly of a catalytically active ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 6621-6625.
104. Beattie, T., Zhou, W., Robinson, M. & Harrington, L. (1998) Reconstitution of human telomerase activity *in vitro*. *Curr. Biol.*, **8**: 177-180.
105. Auterix, C., Pruzan, R., Funk, W. D. & Greider, C. W. (1996) Reconstitution of human telomerase activity and identification of a minimal functional region of the human telomerase RNA. *EMBO J.*, **15**: 5928-5935.

106. Mitchell, J. R., Cheng, J. & Collins, K. (1999) A box H/ACA small nucleolar RNA like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Mol. Cell. Biol.*, **19**: 567–576.
107. Lukowiak, A. A., Narayanan, A., Li, Z-H., Terns, R. M. & Terns, M. P. (2001) The snoRNA domain of vertebrate telomerase RNA functions to localize the RNA within the nucleus. *RNA*, **7**: 1833-1844.
108. Seto, A. G., Zaug, A. J., Sobel, S. G., Wolin, S. L. & Cech, T. R. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particles. *Nature*, **401**: 177-180.
109. Avilion, A. A., Piatyszek, M. A., Gupta, J., Shay, J. W., Bacchetti, S. & Greider, C. W. (1996) Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res.* **56**: 645–650.
110. Yi, X., Tesmer, V. M., Savre-Train, I., Shay, J. W. & Wright, W. E. (1999) Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels. *Mol. Cell. Biol.*, **19**: 3989–3997.
111. Collins, K., Kobayashi, R. & Greider, C. W. (1995) Purification of *Tetrahymena* telomerase and cloning of genes encoding the two proteins components of the enzyme. *Cell*, **81**: 677-686.
112. Ghandi, L. & Collins, K. (1998) Interaction of recombinant *Tetrahymena* telomerase proteins p80 and p95 with telomerase RNA and telomeric DNA substrates. *Genes Dev.*, **12**: 721–733.
113. Mason, D. X., Autexier, Ch. & Greider, C. W. (2001) *Tetrahymena* proteins p80 and p95 are not core telomerase components. *PNAS*, **98**: 12368-12373.
114. Aigner, S., Lingner, J., Goodrich, K. J., Grosshans, Ch. A., Shevchenko, A., Mann, M. & Cech, T.R. (2000) Euplotes telomerase contains an La motif protein produced by apparent translational frameshifting. *EMBO J.*, **19**: 6230-6239.
115. Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Bass, M. B., Arruda, I. & Robinson, M. O. (1997) A mammalian telomerase-associated protein. *Science*, **275**: 973–977.
116. Nakayama, J., Saito, M., Nakamura, H., Matsuura, A. & Ishikawa, F. (1997) TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell*, **88**: 875–884.

117. Harrington, L., Zhou, W., McPhail, T., Oulton, R., Yeung, D. S., Mar, V., Bass, M. B. & Robinson, M. O. (1997) Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev.*, **11**: 3109–3115.
118. Lin, J. J. & Zakian, V. A. (1995) An in vitro assay for *Saccharomyces* telomerase requires EST1. *Cell*, **81**: 1127–1135.
119. Steiner, B. R., Hidaka, K. & Futcher, B. (1996) Association of the Est1 protein with telomerase activity in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 2817–2821.
120. Lingner, J., Cech, T. R., Hughes, T. R. & Lundblad, V. (1997) Three Ever Shorter Telomere (*EST*) genes are dispensable for *in vitro* yeast telomerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**: 11190–11195.
121. Lendvay, T. S., Morris, D. K., Sah, J., Balasubramanian, B. & Lundblad, V. (1996) Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics*, **144**: 1399–1412.
122. Smogorzewska, A. & de Lange, T. (2004) *Regulation* of telomerase by telomeric proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **73**: 177-208.
123. Forsythe, H. L., Jarvis, J. L., Turner, J. W., Elmore, L. W. & Holt, S. E. (2001) Stable association of hsp90 and p23, but Not hsp70, with active human telomerase. *J. Biol. Chem.*, **276**: 15571–15574.
124. Mitchell, J. R., Wood, E. & Collins, K. (1999) A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*, **402**: 551-555.
125. Vulliamy, T. J., Knight, S. W., Mason, P. J. & Dokal, I. (2001) Very short telomeres in the peripheral blood of patients with X-linked and autosomal dyskeratosis congenita. *Blood Cell. Mol. Dis.*, **27**: 353-357.
126. Dragon, F., Pogacic, V. & Filipowicz, W. (2000) *In vitro* assembly of human H/ACA small nucleolar RNPs revealed unique feature of U17 and telomerase RNAs. *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 3037-3048.
127. Pogacic, V., Dragon, F. & Filipowicz, W. (2000) Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10. *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 9028-9040.
128. Fang, G. & Cech, T. (1995) Telomere proteins, in : *Telomeres*, Blackburn, E. & Greider, C. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 69-105.

129. Berman, J., Tachibana, C. Y., Tye, B. K. (1986) Identification of a telomere binding activity from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 3713-3717.
130. Shore, D. & Nasmyth, K. (1987) Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell*, **51**: 721-732.
131. Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L. & de Lange, T. (1997) Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat. Genet.*, **17**: 231-235.
132. Chong, L., Van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., et al. (1995) A human telomeric protein. *Science*, **270**: 1663-1667.
133. Cooper, J., Nimmo, E., Allshire, R. & Cech, T. (1997) Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature*, **385**: 744-747.
134. Spink, K. G., Evans, R. J. & Chambers, A. (2000) Sequence-specific binding of Taz1p dimers to fission yeast telomeric DNA. *Nucleic Acids Res.*, **28**: 527-533.
135. Price, C. M. & Cech, T. R. (1987) Telomeric DNA-protein interaction of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Genes Dev.*, **1**: 783-793.
136. Baumann, P. & Cech, T. R. (2001) Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science*, **292**: 1171-1175.
137. Nugent, C., Hughes, T., Lue, N. & Lundblad, V. (1996) Cdc13p: a single-stranded telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science*, **274**: 249-252.
138. Lin, J. J. & Zakian, V. A. (1996) The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG₁₋₃ telomeric DNA-binding protein *in vitro* that affects telomere behavior *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 13760-13765.
139. Schramke, V., Luciano, P., Brevet, V., Guillot, S., Corda, Y. et al. (2004) RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends. *Nature Genetics*, **36**: 46-54.
140. Marcand, S., Gilson, E. & Shore, D. (1997) A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science*, **275**: 986-990.
141. Dietmann, S., Park, J., Notredame, C., Heger, A., Lappe, M. & Holm, L. (2001) A fully automatic evolutionary classification of protein folds: Dali Domain Dictionary version. *Nucleic Acids Res.* **29**: 55-57.

142. Dietmann, S. & Holm, L. (2001) Identification of homology in protein structure classification. *Nature Struct. Biol.*, **8**: 953-957.
143. Murzin, A.G. (1993) OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding)- fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J.*, **12**: 861-867.
144. Horvard, M. P., Schweiker, V. L., Bevilacqua, J. M., Ruggles, J. A. & Schultz, S. C. (1998) Crystal Structure of the *Oxytricha nova* telomeres end binding protein complex with single strand DNA. *Cell*, **95**: 963-974.
145. Bochkarev, A., Pfuetzner, R. A., Edwards, A. M. & Frappier, L. (1997) Structure of the single-stranded-DNA-binding domain of replication protein A bound to DNA. *Nature*, **385**: 176-181.
146. Mitton-Fry, R. M., Anderson, E. M., Hughes, T. R., Lundblad, V. & Wuttke, D. S. (2002) Conserved structure for single-stranded telomeric DNA recognition. *Science*, **296**: 145-147.
147. Wold, M. S. (1997) Replication Protein A: A heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**: 61-92.
148. Brow, G. W., Melendy, T. E. & Ray, D. S. (1992) Conservation of structure and function of DNA replication protein A in the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 10227-10231.
149. Brow, G. W., Hines, J. C., Fisher, P. & Ray, D. S. (1994) Isolation of the genes encoding the 51-kilodalton and 28-kilodalton subunits of *Crithidia fasciculata* replication protein A. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **63**: 135-142.
150. 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.
151. Qi, H. & Zakian, V. A. (2000) The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase α and the telomerase-associated Est1 protein. *Genes Dev.*, **14**: 1777-1788.

152. 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.
153. Eid, J. & Sollner-Webb, B. (1995) ST-1, a 39-kda 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.
154. Eid, J. & Sollner-Webb, B. (1997) ST-2, a telomere and subtelomere duplex and G-strand binding protein activity in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.*, **272**: 14927-14936.
155. Cano, M. I., Blake, J. J., Blackburn, E. H. & Agabian, N. (2002) A *Trypanosoma brucei* protein that binds G overhangs and co-purifies with telomerase activity. *J. Biol. Chem.*, **277** : 896-906.
156. Sbicego, S., Alfonzo, J. D., Estevez, A. M., Rubio, M. A., Kang, X., Turck, C. W., Peris, M. & Simpson, L. (2003) RBP38, a novel RNA-binding protein from trypanosomatid mitochondria,modulates RNA stability. *Eukaryot.Cell*, **2**: 560 –568.
157. Saldanha, S. N., Andrews, L. G. & Tollefsbol, T. O. (2003) Assessment of telomere length and factors that contribute to its stability. *Eur. J. Biochem.*, **270**: 389-403.
158. Conway, C., McCulloch, R., Ginger, M. L., Robinson, N. P., Browitt, A., Barry, J. D. (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.
159. Kolodner, R. D., Putnam, Ch. D. & Myung, K. (2002) Maintenance of genome stability in *Sacharomyces cerevisiae*.*Science*, **267**: 552-557.
160. de Lange, T. (2004) T-loops and the origin of telomeres. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **5**: 323-329.
161. Chang, S. W-L. & Blackburn, E. H. (2002) New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene*, **21**: 553-563.
162. van Steensel, B. & de Lange, T. (1997) Control of telomere lenght by the human telomeric protein TRF1. *Nature*, **385**: 740-743.
163. Shampay, J., Szostak, J. W. & Blackburn, E. H. (1984) DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature*, **310**:154-157.

164. Shampay, J. & Blackburn, E. H. (1988) Generation of telomere-length heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 534-538.
165. Teixeira, T. M., Arneric, M., Sperisen, P., & Lingner, J. (2004) Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase-extendible and nonextendible states. *Cell*, **117**: 323-335.
166. Evans, S. K. & Lundblad, V. (1999). Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science*, **286**: 117-120.
167. Chandra, A., Hughes, T. R., Nugent, C. I. & Lundblad, V. (2001) Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev.*, **15**: 404-414.
168. Loayza, D., & De Lange, T. (2003). POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature*, **424**: 1013-1018.
169. *Defesa modulada: Avanços contra a leishmaniose envolvem controle da resposta imunológica e do inseto transmissor. Revista Pesquisa, FAPESP*, Fev. 2003, nº 84, p. 36-40.
170. Kim, N. W. & Wu, F. (1997) Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) *Nucleic Acids Res.*, **25**: 2595-2597.
171. Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
172. Lu, Q., Schierer, T., Kang, S. & Henderson, E. (1998) Purification, characterization and molecular cloning of TGP1, a novel G-DNA binding protein from *Tetrahymena thermophila*. *Nucleic Acids Res.*, **26**: 1613-1620.
173. Sabatini, R., Meeuwenoord, N., van Boom, J. H. & Borst, P. (2002) Recognition of base J in duplex DNA by J-binding protein. *J. Biol. Chem.* **277**: 958-966.
174. Hager, D. A. & Burgess, R. R. (1980) Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and others enzymes. *Anal. Biochem.*, **109**: 76-86.
175. Autexier, C., Pruzan, R., Funk, W. D. & Greider, C. W. (1996) Reconstitution of human telomerase activity and identification of a minimal functional region of the human telomerase RNA. *EMBO. J.*, **15**: 5928-5935.

176. Krüpp, G., Kühne, K., Tamm, S., Klapper, W., Heidorn, K., Rott, A., Parwaresch, R. (1997) Molecular basis of artifacts in the detection of telomerase activity and a modified primer for a more robust "TRAP" assay. *Nucleic Acid Res.*, **25**: 919-921.
177. Aldous, W. K., Martin, R. K. & Kyle, D. E. (1998) Stage specific detection and inhibition studies of *Plasmodium falciparum* telomerase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **95**: 281-285.
178. Bottius, E., Bakhsis, N. & Scherf, A. (1998) *Plasmodium falciparum* telomerase: de novo telomere addition to telomeric and nontelomeric sequences and role in chromosome healing. *Mol. Cell. Biol.*, **18**: 919-925.
179. Virta-Pearlman, V., Morris, D. K. & Lundblad, V. (1996) Est1 has the properties of a single-stranded telomere end-binding protein. *Genes Dev.*, **10**: 3094-3104.
180. Johnston, S., Lew, J. & Berman, J. (1999) Gbp1 a protein with RNA recognition motifs binds single-stranded telomeric DNA and changes its binding specificity upon dimerization. *Mol. Cell. Biol.*, **19**: 923-933.
181. Privalov, P. L. & Gill, S. J. (1988) Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *Adv. Protein Chem.*, **39**: 191-234.
182. Duhagon, M. A., Dallagiovanna, B., Ciganda, M., Ruyechan, W., Williams, N. & Garat, B. (2003) A novel type of single-stranded nucleic acid binding protein recognizing a highly frequent motif in the intergenic regions of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **309**: 183-188.
183. Bessler, J. B., Torredagger, J. Z. & Zakian, V. A. (2001) The Pif1p subfamily of helicases: region-specific DNA helicases? *Trends Cell. Biol.*, **11**: 60 –65.
184. Lakowiks, J. R. (1983) In, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Ed. Lakowiks, J.R. Plenum Press, New York.
185. Gomes, X. V. & Wold, M. S. (1996) Functional Domains of the 70-Kilodalton Subunit of Human Replication Protein A. *Biochemistry*, **35**: 10558-10568.
186. Brill, S. J. & Bastin-Shanower, S. A. (1998) Identification and Characterization of the Fourth Single-Stranded-DNA Binding Domain of Replication Protein A. *Mol. Cell. Biol.*, **18**: 7225-7234.
187. Bastin-Shanower, S. A. & Brill, S. J. (2001) Functional Analysis of the Four DNA Binding Domains of Replication Protein A. *J. Biol. Chem.*, **276**: 36446-36453.

188. Wang, W., Skopp, R., Scofield, M. & Price, C. (1992) *Euplotes crassus* has genes encoding telomere-binding proteins and telomere-binding protein homologs. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 6621-6629.
189. Theobald, D. L., Mitton-Fry, R. M. & Wuttke, D. S. (2003) Nucleic acid recognition by OB-fold proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **32**: 115-133.
190. Gadgil, H., Oak, S. A. & Jarrett, H. W. (2001) Affinity purification of DNA-binding proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **49**: 607-624.
191. Bauer, A. & Kuster, E. (2003) Affinity purification-mass spectrometry: Powerful tools for the characterization of protein complexes. *Eur. J. Biochem.*, **270**: 570-578.
192. Aebersold, R. & Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomic. *Nature*, **422**: 198-207.
193. Smolka, M., Zhou, H. & Aebersold, R. (2002) Quantitative Protein Profiling Using Two-dimensional Gel Electrophoresis, Isotope-coded Affinity Tag Labeling, and Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics*, **1**:19-29.