

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Miriam Aparecida Giardini



**“Caracterização Bioquímica e Molecular do Componente
Transcriptase Reversa da Telomerase de *Leishmania* spp.”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
MIRIAM APARECIDA GIARDINI
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

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

Campinas, 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

G349c

Giardini, Miriam Aparecida
Caracterização bioquímica e molecular do componente
transcriptase reversa da telomerase de *Leishmania* spp. /
Miriam Aparecida Giardini. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadora: Maria Isabel Nogueira Cano.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Telômeros. 2. Telomerase. 3. Transcriptase
Reversa da Telomerase (TERT). 4. *Leishmania*. I. Cano,
Maria Isabel Nogueira. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Biochemical and molecular characterization of the *Leishmania* spp. telomerase reverse transcriptase component.

Palavras-chave em inglês: Telomeres; Telomerase; Telomerase Reverse Transcriptase (TERT); *Leishmania*.

Área de concentração: Genética de Microorganismos.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Maria Isabel Nogueira Cano, Celso Eduardo Benedetti, Otavio Henrique Thiemann; João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa; Márcia Regina Machado dos Santos.

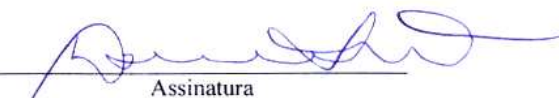
Data da defesa: 14/06/2007.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 14 de junho de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Nogueira Cano (Orientadora)
(Titular)


Assinatura

Profa. Dr. Celso Eduardo Benedetti
(Titular)


Assinatura

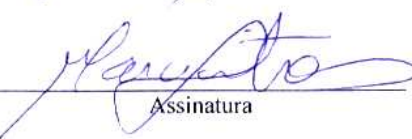
Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann
(Titular)


Assinatura

Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa
(Titular)


Assinatura

Prof^a. Dr^a. Márcia Regina Machado dos Santos
(Titular)


Assinatura

Prof^a. Dr^a. Anete Pereira de Souza
(Suplente)

Assinatura

Prof. Dr. Eduardo Gorab
(Suplente)

Assinatura

Prof^a. Dr^a. Selma Giorgio
(Suplente)

Assinatura

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	viii
GLOSSÁRIO E ABREVIATURAS	x
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Os parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	1
1.1.1. Classificação taxonômica	2
1.1.2. Ciclo de vida	3
1.2. Leishmaniose	5
1.2.1. Manifestações clínicas da doença	5
1.2.2. Distribuição geográfica e epidemiologia	7
1.2.3. Co-infecção <i>Leishmania</i>/HIV	8
1.2.4. Tratamentos disponíveis para as diferentes formas clínicas da leishmaniose	10
1.3. Organização genômica de <i>Leishmania</i> spp.	11
1.4. Telômeros	12
1.4.1. Características gerais	12
1.4.2. Telômeros de <i>Leishmania</i> spp.: organização e estrutura	16
1.4.3. A replicação dos telômeros	20
1.5. Telomerase	22
1.5.1. Características gerais: estrutura, função e atividade enzimática	22
1.5.2. Composição do complexo holoenzimático da telomerase	24
1.5.2.1. O componente protéico TERT	25
1.5.2.2. O componente RNA da telomerase	29
1.5.2.3. Outros componentes protéicos do complexo holoenzimático da telomerase	32
1.5.3. Replicação dos telômeros pela telomerase	33
1.5.4. Regulação da atividade de telomerase por proteínas que atuam nos telômeros	34
1.5.5. A telomerase em protozoários patogênicos	36

2. OBJETIVOS	38
3. SOBRE A APRESENTAÇÃO DESTA TESE	38
4. CAPÍTULO I	40
4.1. CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA O COMPONENTE TRANSCRIPTASE REVERSA DA TELOMERASE DE <i>Leishmania amazonensis</i>.	40
4.1.1. Resumo em português	40
4.1.2. ARTIGO I: The putative telomerase reverse transcriptase component of <i>Leishmania amazonensis</i> : gene cloning and characterization.	40
4.2. RESULTADOS COMPLEMENTARES:	49
4.2.1. Considerações iniciais	49
4.2.2. Material e Métodos	49
4.2.2.1. Cultura de bactérias	49
4.2.2.2. Estratégia de clonagem das diferentes porções do gene LaTERT	49
4.2.2.3. Indução da expressão e extração das proteínas recombinantes	51
4.2.2.4. Ressolubilização e purificação da proteína recombinante LaTERT RT	52
4.2.2.5. Protocolo de imunização de coelhos para a obtenção de anticorpos contra LaTERT RT	54
4.2.2.6. Preparação dos extratos de proteínas S100 e purificação em coluna de DEAE Sepharose	54
4.2.2.7. Imunodeteção da LaTERT nativa e de suas formas truncadas por “Western Blotting”	55
4.2.2.8. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)	55
4.2.3. Resultados e Discussão	56
4.2.3.1. Os fragmentos correspondentes ao domínio RT e à região N-terminal do gene LaTERT foram amplificados e clonados	56
4.2.3.2. As proteínas recombinantes LaTERT RT e LaTERT N-terminal foram expressas de forma insolúvel em sistema bacteriano	58
4.2.3.3. A proteína LaTERT nativa foi reconhecida pelo anticorpo anti-LaTERT RT em experimentos de “Western Blotting”	61
4.2.3.4. A telomerase de <i>L. amazonensis</i> interage com o DNA telomérico <i>in vivo</i>	63

4.2.4. Conclusões deste capítulo	64
5. CAPÍTULO II	65
5.1. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA TELOMERASE DE <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	65
5.1.1. Resumo em português	65
5.1.2. ARTIGO II: <i>Leishmania amazonensis</i> telomerase: purification and biochemical properties.	65
5.1.3. Conclusões deste capítulo	84
6. CAPÍTULO III	85
6.1. Considerações iniciais	85
6.2. GERAÇÃO DE FERRAMENTAS PARA A PURIFICAÇÃO DO COMPLEXO HOLOENZIMÁTICO DA TELOMERASE DE <i>Trypanosoma brucei</i> UTILIZANDO O SISTEMA “PTP-TAGGING”	86
6.2.1. Material e Métodos	86
6.2.1.1. Cultivo de formas procíclicas de <i>T. brucei</i>	86
6.2.1.2. Clonagem das regiões 5' e 3' não traduzidas (UTR) do gene TbTERT no vetor pKO-Fleo	86
6.2.1.3. Clonagem de um fragmento do gene TbTERT no vetor pC-PTP-Neo	87
6.2.1.4. Transfecção de formas procíclicas de <i>T. brucei</i> com as construções TbTERT-5'-3'-pKO-Fleo e pC-PTP-Neo-TbTERT	88
6.2.1.5. Análise por PCR da correta integração do cassete contendo o gene Fleo no <i>locus</i> do gene TbTERT	89
6.2.2. Resultados obtidos	89
6.2.2.1. Substituição de um dos alelos do gene TbTERT nativo	89
6.2.2.2. Análise parcial da integração correta do cassete contendo o gene da fleomicina no <i>locus</i> gênico de TbTERT	91
6.2.2.3. Marcação do outro alelo TbTERT nativo com a etiqueta PTP	93
6.3. TENTATIVA DE IDENTIFICAÇÃO DO RNA DA TELOMERASE DE TRIPANOSSOMATÍDEOS	96
6.3.1 Material e Métodos	96
6.3.1.1. Ensaios de “primer extension” e de seqüenciamento	96

6.3.2. Resultados preliminares obtidos	97
6.3.2.1. Identificação de uma sequência candidata ao gene do componente TER de <i>T. brucei</i>	97
7. CAPÍTULO IV	103
7.1. AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DE PROTEÍNA HOMÓLOGA À PinX1 EM <i>L. amazonensis</i>	103
7.1.1. Considerações iniciais	103
7.1.2. Material e Métodos	103
7.1.2.1. Identificação de sequência de <i>Leishmania</i> similar à hPinX1 e desenho dos oligonucleotídeos iniciadores	103
7.1.2.2. Amplificação e clonagem da putativa PinX1 de <i>L. amazonensis</i> a partir de DNA genômico	103
7.1.3. Resultados e Discussão	104
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
10. ARTIGOS EM CO-AUTORIA	122
10.1. ARTIGO III: Telomere biology of trypanosomatids: beginning to answer some questions.	122
10.1.1. Resumo em inglês	122
10.1.2. Resumo em português	122
10.2. ARTIGO IV: <i>Leishmania</i> replication protein A-1 binds <i>in vivo</i> single-stranded telomeric DNA.	123
10.2.1. Resumo em inglês	123
10.2.2. Resumo em português	123
10.3. ARTIGO V: LaRbp38: a <i>Leishmania amazonensis</i> protein that binds nuclear and kinetoplast DNAs.	124
10.3.1. Resumo em inglês	124
10.3.2. Resumo em português	124
11. ANEXO: Declaração para a CEEA/IB - UNICAMP	126

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus em primeiro lugar, por ter me colocado na posição onde estou e por ter me ensinado tantas coisas com as belezas e as dificuldades que surgiram em meu caminho! Agradeço também por ter colocado tantas pessoas especiais em minha vida, uma por uma!

Gostaria de dedicar esta tese aos meus pais, Walpheu e Maria! E gostaria de agradecê-los imensamente por todo o apoio, todo o incentivo, toda a força e todo o amor e carinho que me deram nesta vida!

Agradeço ao Jair, meu marido e amigo do peito, que por tanto tempo vem compartilhando comigo todas as alegrias, todos os sofrimentos, todas as lágrimas e sorrisos que passaram pelo meu rosto. Muito obrigada por estar ao meu lado hoje e sempre!

Obrigada aos meus irmãos, Victor, William e Winston, que sempre estiveram ao meu lado e sempre me ensinaram a beleza do amor familiar vencendo todos os obstáculos! Obrigada às minhas cunhadas, Cláudia, Eiko e Patrícia, pelo carinho que sentem por mim e pelos ensinamentos de mães e amigas que me deram desde que nos conhecemos! Obrigada aos meus sobrinhos todos, Isabella, Ana Laura, Luccas, Guilherme, Giovanna e Letícia, por serem crianças tão queridas e especiais que me dão tantas alegrias e sorrisos!

Gostaria de agradecer à Professora Maria Isabel, por ter me proporcionado condições para crescer como estudante, como pesquisadora e, principalmente, como pessoa. Obrigada por todos os momentos de carinho e também por todas as broncas! Pelos almoços, cafezinhos, doces e festas compartilhados em tantos anos de convivência!

Agradeço aos meus queridos colegas de laboratório Tininha, Jair, Fábio, Arina, Marcelo, Rita, Joseane, Denise e Maribel, pelos momentos de trabalho em conjunto, por todo o companheirismo e amizade que me ofereceram durante estes quatro anos! Um obrigado especial àqueles que se tornaram meus grandes amigos!

Agradeço agora aos meus amigos do coração, Bia e Jorge, Tininha e Tiago, Fábio e Ana Luiza, Luciana Harumi, Arina e Jair, de novo, pela imensa amizade que têm por mim, pelos ombros amigos, pelos telefonemas, pelos conselhos e palavras de apoio. Obrigada também à Ana Flávia, Mariana, Renatinho, Rapha, Vitinho e André! Obrigada pelas cartinhas, cartões, fotos, histórias, abraços apertados e marcas de batom na bochecha! Vocês são muito especiais para mim! E obrigada aos meus amigos de Sorocaba, Ana Flavia, Yeidi, Lílian, Eber, Isabella, Victor, Fabiana, Fernando, Ana Lúcia, Lalau, Guilherme e Patrícia Consolmagno, por todos os anos de amizade na minha infância e na minha juventude.

Gostaria de agradecer aos professores Dr. David Campbell e Dr^a. Nancy Sturm, que me supervisionaram durante o estágio na UCLA, por terem me acolhido em sua casa e em seu laboratório, passando vários ensinamentos. Agradeço também aos colegas do laboratório da UCLA, Jesse Zamudio, Bidyottam Mittra, Bob Hitchcock, Bridget LaMonica, Isadora Trejo, e também a Augusto e Patrícia Barbosa, Katerina Pejchalova e Edward Tsai.

Agradeço aos colaboradores e colegas do LNLS, professor Dr. Carlos Ramos, Dr^a. Letícia Khater, Veruska e Karina. E aos colaboradores Luís Antônio Peroni e José Raimundo, por terem me ajudado na obtenção dos anticorpos policlonais.

Agradeço também aos professores Dr. Carlos Ramos e Dr. João Alexandre Barbosa pelas críticas e sugestões dadas durante a realização da pré-banca. E à Lourdes, por tantas vezes ter me ajudado nos intrincados processos burocráticos da Pós-Graduação da UNICAMP.

Agradeço aos professores Dr^a. Márcia Regina, Dr. Celso Benedetti, Dr. João Alexandre e Dr. Otavio Thiemann por terem aceitado participar da minha banca de defesa de tese.

Gostaria de agradecer finalmente às agências financiadoras FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo financiamento do projeto, e OMS (Organização Mundial de Saúde – WHO/TDR – UNDP Bank) pelo financiamento dos projetos do laboratório.

GLOSSÁRIO E ABREVIATURAS

3'UTR – região 3' não traduzida;

5'UTR – região 5' não traduzida;

AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida;

ALT – extensão alternativa dos telômeros;

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

Cassete – termo utilizado para designar o conjunto de uma região codificadora de gene e de suas regiões 5' e 3' não traduzidas;

CDC13 – “cell division cycle 13”;

cDNA – DNA complementar;

ChIP – imunoprecipitação de cromatina;

dATP ou A – desoxiadenosina trifosfato;

dCTP ou C – desoxicitidina trifosfato;

DEAE Sepharose – resina de sepharose contendo o trocador aniônico dietilaminoetil;

dGTP ou G – desoxiguanosina trifosfato;

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

DNA – ácido desoxirribonucléico;

dNTP – desoxirribonucleosídeos trifosfato;

Est1-3 – “ever shorter telomeres 1-3”;

HIV-1 – vírus da imunodeficiência humana tipo 1;

hTR – componente RNA da telomerase de humanos;

IFD – inserção no domínio dos dedos;

IP – imunoprecipitação;

IPTG – isopropil- β -D tiogalactopiranosídeo;

kDNA – DNA do cinetoplasto;

LaGT1-3 – “*Leishmania amazonensis* G-strand telomeric protein 1-3”;

LaPinX1 – proteína de *L. amazonensis* homóloga à PinX1, uma potente inibidora da atividade da telomerase em humanos e outros mamíferos;

LaTAF – “*Leishmania amazonensis* telomere associated factor”;

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

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

LC – leishmaniose cutânea;

LCD – leishmaniose cutânea difusa;

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

LMC – leishmaniose mucocutânea;

LPG – lipofosfoglicano;

LTR – repetições terminais longas;

LV – leishmaniose visceral;

mRNA – RNA mensageiro;

NaAc – acetato de sódio;

nt – nucleotídeo;

OMS – Organização Mundial da Saúde;

p65, p45, p75 e p20 – proteínas do complexo holoenzimático da telomerase de *Tetrahymena*;

pb – pares de bases;

pC-PTP-Neo – vetor utilizado para a marcação do gene TERT com a etiqueta PTP, o qual contém o gene que confere resistência ao antibiótico G418;

PCR – reação em cadeia da polimerase;

pCR[®] 2.1 – vetor utilizado para a clonagem das seqüências do gene TERT;

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

PinX1 – proteína que interage com Pin2/TRF1;

pK – proteinase K;

pKO-Fleo – vetor utilizado para nocautear o gene TERT em *Trypanosoma brucei*, o qual contém o gene que confere resistência ao antibiótico fleomicina;

POT1 – “*protection of telomeres 1*”;

Primer extension – extensão de oligonucleotídeo;

Pseudoknot – estrutura terciária de RNA contendo duas estruturas na forma de “stem-loop”, sendo que o primeiro “stem-loop” forma parte do segundo.

PTP-tagging – marcação com a etiqueta PTP;

RAP1 – “*repressor/activator protein 1*”;

RBP38 – “*RNA binding protein 38*”;

RNA – ácido ribonucléico;
RNase A – ribonuclease A;
RNP – complexo ribonucleoprotéico;
RPA1 – “replication protein A – 1”;
RT – transcriptase reversa;
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio;
TbTERT – componente transcriptase reversa da telomerase de *Trypanosoma brucei*;
TEN – extremo N-terminal da proteína TERT;
TER – RNA da telomerase;
TERT – transcriptase reversa da telomerase;
TLC 1 – componente RNA da telomerase de *Saccharomyces cerevisiae*;
T-loop – “loop” do telômero;
TNF- α - fator de necrose tumoral α ;
TPP1 – “POT1 and TIN2-interacting protein”
TRF1-2 - “TTAGGG repeat binding factor 1-2”;
TTP ou T – desoxitimidina trifosfato;
Two-tube TRAP – protocolo de amplificação de repetições teloméricas em dois tubos.

RESUMO

Telômeros são complexos DNA-proteínas que protegem os cromossomos eucarióticos da degradação, garantindo estabilidade genômica. As seqüências teloméricas são ricas em G e apresentam uma protrusão 3' simples-fita que se estende em direção ao terminal cromossômico. Em *Leishmania*, os telômeros são compostos pela seqüência repetida 5'-TTAGGG-3' e são replicados pela telomerase, a principal responsável pela manutenção dos terminais cromossômicos em eucariotos. Além de replicar os telômeros, o complexo holoenzimático da telomerase, composto pela transcriptase reversa da telomerase (TERT), pelo RNA da telomerase (TER) e por proteínas associadas, também atua como parte de um complexo de ordem maior que protege os terminais teloméricos. O entendimento do mecanismo de regulação da manutenção telomérica será de grande valor científico e poderá levar ao descobrimento de algum alvo potencial para o desenvolvimento de novas drogas anti-leishmania.

Com esse objetivo, identificamos, clonamos e caracterizamos o gene que codifica o componente TERT em *Leishmania* spp.. O alinhamento múltiplo das seqüências através do programa ClustalW demonstrou que as telomerases de *Leishmania* apresentam muito mais homologia entre si do que com as proteínas de outros kinetoplastídeos e eucariotos. Experimentos de caracterização indicaram que a seqüência putativa do gene da telomerase de *Leishmania* localiza-se provavelmente em cópia única nos maiores cromossomos. Um único transcrito de RNA mensageiro foi encontrado nos promastigotas. Análises filogenéticas sugeriram que a telomerase de *Leishmania* pode representar uma ligação entre os mais antigos e os mais novos ramos das telomerases. Além disso, proteínas recombinantes foram expressas em sistema bacteriano, tornando possível a produção de anticorpos policlonais em coelhos. Experimentos de “Western blotting” e imunoprecipitação de cromatina indicaram que o anticorpo foi capaz de reconhecer a proteína nativa e que a telomerase de *L. amazonensis* interage *in vivo* com a seqüência telomérica rica em G.

A atividade de telomerase de *L. amazonensis* foi purificada utilizando-se uma combinação de colunas cromatográficas. Testou-se a atividade enzimática em cada passo da purificação utilizando-se o ensaio “Two-tube TRAP”. Os resultados mostraram que a atividade enzimática é encontrada nas frações purificadas pelas cromatografias de troca iônica, de afinidade por Heparina e de gel filtração. A atividade foi altamente enriquecida após a

purificação por afinidade utilizando um oligonucleotídeo de DNA telomérico rico em G. Quando foi utilizado um oligorribonucleotídeo 2'*O*-metil complementar à putativa sequência molde do TER de *Leishmania* como ligante na cromatografia de afinidade, pouca ou nenhuma atividade enzimática foi eluída da resina, sugerindo que a interação entre a telomerase de *L. amazonensis* e este oligorribonucleotídeo é tão forte que não permite sua dissociação nas condições de eluição gentis necessárias para manter a atividade enzimática.

Formas procíclicas de *Trypanosoma brucei* foram utilizadas para a construção do sistema “PTP-tagging”, no intuito de futuramente purificar o complexo holoenzimático da telomerase. Em paralelo, ensaios de “primer extension” foram padronizados e identificou-se uma sequência candidata ao gene do RNA da telomerase de *T. brucei*. Também foi identificada e clonada em *L. amazonensis*, uma sequência homóloga à PinX1 humana, descrita como uma proteína que interage diretamente com a TERT humana e considerada um inibidor natural da atividade de telomerase.

ABSTRACT

Telomeres are protein-DNA complexes that protect linear chromosomes from degradation, providing genomic stability. The telomeric sequences are G-rich and contain a 3' single-stranded region that protrudes toward the chromosome end. In *Leishmania*, the telomeric DNA is composed by the conserved 5'-TTAGGG-3' repeated sequence and it is replicated by telomerase. Telomerase is responsible for maintaining chromosome ends in most eucaryotes by adding new telomeric sequences to the G-rich strand. Besides replicating telomeres, the telomerase holoenzyme complex, composed by the reverse transcriptase component (TERT), the telomerase RNA (TER) and associated proteins, also works as part of the higher order complex that protects telomeric ends. Understanding the regulation of the telomeric maintainance mechanism may allow the discovery of potential targets to the development of new anti-leishmania drugs.

Therefore, we identified, cloned and characterized the TERT gene in *Leishmania* spp.. A ClustalW multiple-sequence alignment demonstrated that the *Leishmania* telomerases show greater homology with each other than with the proteins of other kinetoplastids and eukaryotes. Characterization experiments indicated that the putative *Leishmania* TERT gene was probably located in single copy at the largest chromosomes. A single messenger RNA transcript was found in promastigotes. Phylogenetic analysis suggested that *Leishmania* telomerase might represent a liaison between the oldest and the newest branches of telomerases. Besides that, recombinant proteins were expressed in bacterial system, allowing production of anti-LaTERT polyclonal serum in rabbits. Western blotting and chromatin immunoprecipitation assays indicated that the anti-LaTERT serum was able to recognize a native protein in nuclear and total extracts of the parasite and that *L. amazonensis* telomerase interacts *in vivo* with the G-rich telomeric sequence.

We have also purified the *L. amazonensis* telomerase activity in order to better understand its biochemical features. Protein extracts of *L. amazonensis* containing telomerase activity were purified using combined chromatographic columns. Enzyme activity was tested in each purification step using the "Two-tube TRAP" assay. The results showed that enzyme activity is found in fractions purified by ion exchange (DEAE), Heparin affinity and gel filtration chromatographic methods. The activity was greatly enriched after affinity purification using a G-

rich telomeric DNA oligonucleotide as the ligand. When a 2'*O*-methyl oligoribonucleotide complementary to the putative *L. amazonensis* TER template was used as a ligand in the affinity purification, little or no enzyme activity was eluted from resin, suggesting that the interaction between *L. amazonensis* telomerase and this oligoribonucleotide is too strong that disables its dissociation under the gentle elution conditions necessary to maintain enzyme activity.

In order to identify the telomerase holoenzyme components, procyclic forms of *Trypanosoma brucei* were used to construct the PTP-tagging system. “Primer extension” reactions were also done in order to isolate and sequence an RNA candidate for the telomerase RNA gene in *T. brucei*. In addition, we have cloned a *L. amazonensis* homologue of the human PinX1 protein, previously known as a hTERT-interacting factor and as a potent telomerase inhibitor .

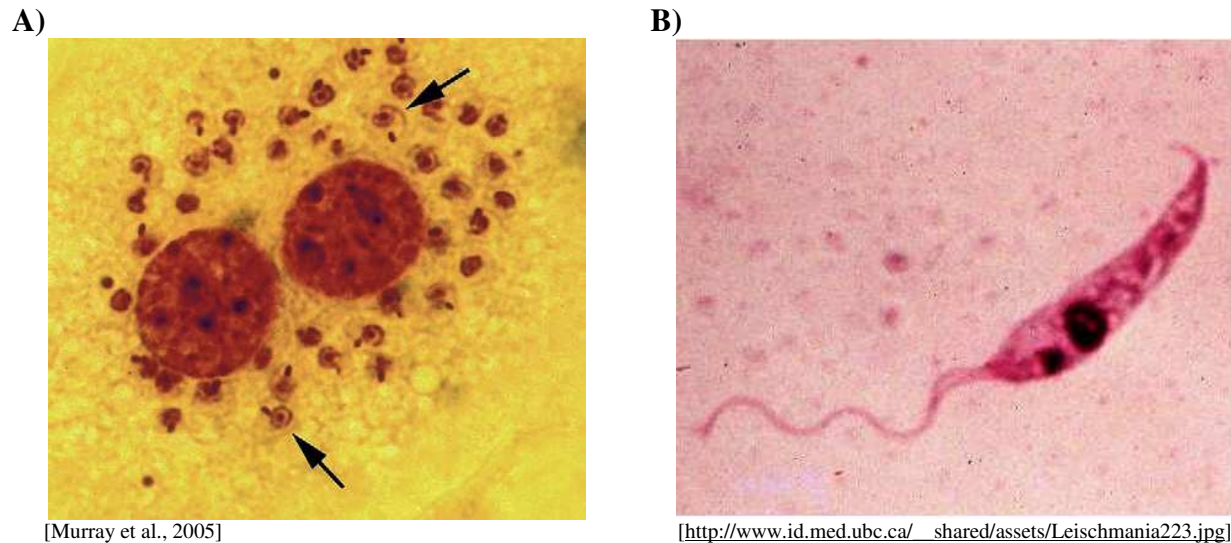
1. INTRODUÇÃO

1.1. Os parasitas do gênero *Leishmania*

Os parasitas do gênero *Leishmania* são organismos unicelulares que pertencem à Ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, somando cerca de 25 espécies distintas, algumas de grande interesse para a parasitologia médica [Neves, 2003]. As leishmanias são protozoários flagelados que possuem uma organela citoplasmática fusiforme bastante peculiar, que é semelhante a uma mitocôndria e é rica em DNA mitocondrial (kDNA), denominada de cinetoplasto [Simpson, 1987].

Todas as espécies de *Leishmania* são heteroxênicas, ou seja, necessitam de dois hospedeiros durante o seu ciclo biológico [Neves, 2003]. Assim, durante o seu ciclo de vida, os parasitas do gênero *Leishmania* podem se apresentar sob duas diferentes formas: os amastigotas e os promastigotas. Os amastigotas são formas esféricas ou ovais, que não apresentam flagelo livre e que são normalmente encontradas no interior dos macrófagos de mamíferos. Elas medem de 1,5-3,0 μm x 3,0-6,5 μm de diâmetro, dependendo da espécie, e apresentam no seu interior um núcleo grande e arredondado e o cinetoplasto em forma de grão ou bastonete. Já os promastigotas são formas alongadas, que apresentam um flagelo livre longo sem membrana ondulante que emerge da parte anterior do corpo do parasita e que são encontradas no interior do tubo digestivo do inseto vetor. As dimensões dos promastigotas variam de 10,0-40,0 μm em comprimento e de 1,5-3,0 μm em seu diâmetro menor. Apresentam um núcleo arredondado ou oval que se situa na porção mediana ou anterior do parasita, e o cinetoplasto, também em forma de grão ou bastonete, localiza-se entre o núcleo e a extremidade anterior do flagelado [Neves et al., 2000]. Os promastigotas apresentam ainda várias formas de transição no interior do intestino do inseto vetor até se diferenciarem completamente em promastigotas metacíclicos, formas também flageladas que possuem mobilidade intensa e são altamente infecciosas para o hospedeiro mamífero. Algumas espécies de *Leishmania* também podem desenvolver no hospedeiro invertebrado formas paramastigotas, que são pequenas, arredondadas ou ovais, com tamanho variando de 5,0-10,0 μm x 4,0-6,0 μm , e possuem um flagelo curto que se exterioriza na

região anterior do corpo do parasita. Estes protozoários são os agentes etiológicos da doença conhecida como leishmaniose, e as suas formas amastigota e promastigota estão exemplificadas na Figura 1.



1.1.1. Classificação taxonômica

Os parasitas do gênero *Leishmania* pertencem ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophorea, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae [Neves et al., 2000].

O gênero *Leishmania* apresenta cerca de 25 espécies que parasitam mamíferos e répteis, das quais 5 foram descritas parasitando mamíferos no Velho Mundo, 10 parasitando mamíferos no Novo Mundo e 10 parasitando répteis em diferentes países. Dentro deste gênero, encontram-se os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, que estão agrupados como descrito por Lainson e Shaw em 1987 [Neves et al., 2000].

1) Subgênero *Leishmania* → inclui parasitas encontrados no Velho e Novo Mundo e 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* inclui também outras espécies que ainda não foram agrupadas em complexos, como: *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 e 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*.

1.1.2. Ciclo de vida

O ciclo de vida heteroxeno dos parasitas do gênero *Leishmania* inclui um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado [Rey, 2001]. 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 [Neves et al., 2000].

Os hospedeiros invertebrados são pequenos insetos hematófagos da ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo [Neves et al., 2000, Rey, 2001] (Figura 2).



Figura 2 – Inseto flebotomíneo vetor da leishmaniose
[<http://pathmicro.med.sc.edu/lecture/sandfly.jpg>].

Os mamíferos são infectados no momento em que são picados por um inseto fêmea dos gêneros *Lutzomyia* ou *Phlebotomus* contendo formas promastigotas infectantes em seu aparelho bucal. Isso ocorre porque todo inseto hematófago, antes de sugar o sangue, inocula saliva na pele do mamífero enquanto introduz sua probóscide; esta saliva contém anestésicos, vasodilatadores e imunossupressores, além dos parasitas. Assim, ao entrar em contato com a pele do hospedeiro mamífero, a forma promastigota infectante cai na sua corrente sanguínea e adere-se a um macrófago. Como defesa, este macrófago passa a liberar radicais óxidos, hidroxilas, hidróxidos e superóxidos que são altamente lesivos para as membranas celulares, mas o parasita consegue escapar da agressão graças às moléculas de glicoproteínas e glicofosforoglicanos que apresentam em sua superfície celular. Essas substâncias são importantes também durante o processo de endocitose realizado pelo macrófago. Após a interiorização do parasita pelo macrófago, ocorre a fusão dos lisossomos com o fagossomo, e o parasita, para se adaptar ao novo ambiente, transforma-se em amastigota. Essa forma é capaz de se desenvolver e se multiplicar no meio ácido existente dentro do vacúolo digestivo, que não consegue destruir o parasita. A forma amastigota passa a se multiplicar intensamente por divisão binária simples. O processo se repete até que o macrófago se rompe e libera os amastigotas que serão fagocitados por outros macrófagos. Dependendo da espécie de *Leishmania*, os amastigotas permanecerão no local da picada formando úlceras ou alcançarão as vísceras (baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides), onde também se reproduzirão dentro dos macrófagos. O flebotomíneo fêmea se infectará ao exercer sua hematofagia em um mamífero infectado por *Leishmania*. Ao ingerir o sangue, estará ingerindo juntamente alguns amastigotas presentes no sangue ou na linfa intersticial [<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm>]. Um esquema do ciclo de vida do parasita do gênero *Leishmania* está ilustrado na Figura 3.

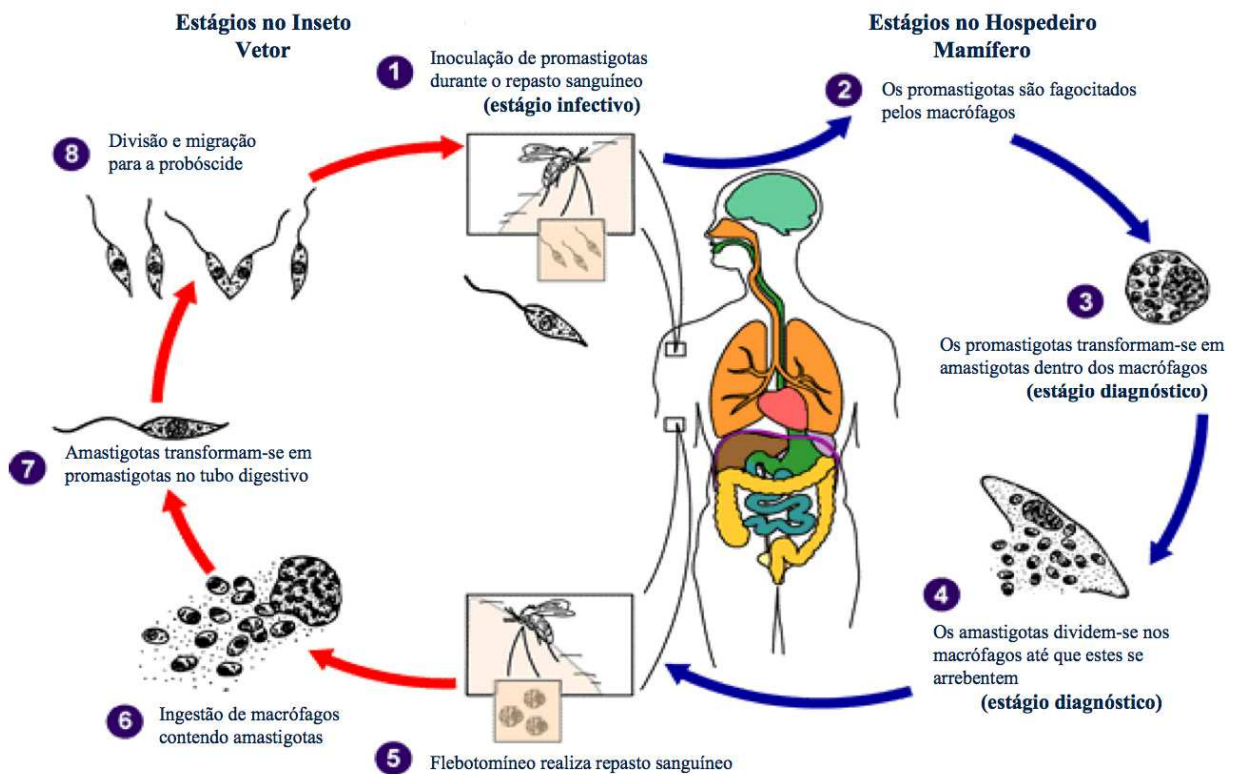


Figura 3 – Ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania* [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Leishmaniasis_il.htm]. À esquerda, com as setas em vermelho, estão esquematizados os estágios do ciclo de vida do parasita que ocorrem dentro do inseto vetor. À direita, com as setas em azul, estão os estágios que ocorrem dentro do hospedeiro mamífero. Estão indicados também os estágios onde ocorre a infecção (passo 1) e nos quais pode-se realizar o diagnóstico da doença (passos 3 e 4).

1.2. Leishmaniose

1.2.1. Manifestações clínicas da doença

Dependendo dos fatores de virulência do parasita infectante e da resposta imune do hospedeiro humano, um grande espectro de doenças pode se manifestar sob diferentes formas clínicas [Neves et al., 2000].

A Organização Mundial da Saúde (OMS, www.who.int/health_topics/leishmaniasis/) classifica as leishmanioses em quatro formas clínicas principais:

1) Leishmaniose visceral (LV):

Também conhecida como “calazar”, a LV é a forma mais grave da doença, na qual os parasitas apresentam tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear do baço, do fígado, da medula óssea e dos tecidos linfóides. Caracteriza-se por: febre intermitente, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e/ou linfadenopatias e anemia. Causa uma epidemia de larga escala com alta taxa de fatalidade [Desjeux, 2004].

2) Leishmaniose cutânea (LC):

Nesta forma clínica, os pacientes apresentam exclusivamente lesões cutâneas, limitadas, que podem ser ulceradas ou não. Apresenta normalmente uma cura espontânea, mas quando as lesões são múltiplas, desfigurantes e desabilitantes, ela cria um estigma estético de longa duração. Sua forma mais severa, a leishmaniose recidiva, é muito difícil de ser tratada [Desjeux, 2004].

3) Leishmaniose mucocutânea (LMC):

Também conhecida como úlcera de Bauru, é a forma da doença em que os parasitas apresentam afinidade por áreas descobertas da pele e levam à extensiva destruição das mucosas da boca, nariz e faringe, causando lesões desfigurantes, mutilação da face e grande sofrimento pelo resto da vida. Está normalmente relacionada com as espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, como *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, mas também já foi descrita no Velho Mundo [Desjeux, 2004].

4) Leishmaniose cutânea difusa (LCD):

Esta forma clínica ocorre em indivíduos que apresentam uma resposta imune celular deficiente e se caracteriza pela presença de lesões disseminadas. Pode ocorrer também de forma tardia em pacientes que tiveram leishmaniose visceral e se trataram. Sua severidade é devida à aparência leprosa das lesões, que nunca são curadas espontaneamente e que são sujeitas a uma recidiva após o tratamento com drogas [Desjeux, 2004].

Na Figura 4, estão ilustrados alguns casos de LC, LMC e LV.



Figura 4 – Diferentes manifestações clínicas da leishmaniose [<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/leishmaniasis.html>]. **A)** leishmaniose do tipo cutânea (LC); **B)** leishmaniose do tipo mucocutânea (LMC); **C)** leishmaniose do tipo visceral (LV).

1.2.2. Distribuição geográfica e epidemiologia

Epidemiologicamente, as infecções são consideradas zoonóticas quando os animais servem de reservatório e antroponóticas quando os reservatórios são os humanos. Nas leishmanioses zoonóticas, a transmissão se dá principalmente nas áreas rurais e periurbanas, enquanto a transmissão das leishmanioses antroponóticas ocorre nas áreas urbanas [Ministério da Saúde, 2006]. A leishmaniose é uma doença que está distribuída em pelo menos 88 países: 72 são países em desenvolvimento e 13 deles estão entre os menos desenvolvidos do mundo [Desjeux, 2004]. Estima-se que 12-15 milhões de indivíduos encontram-se infectados atualmente por alguma espécie do gênero *Leishmania* e que 350 milhões estão sob risco de infecção [WHO, 1995].

A LV ocorre em 65 países, sendo que 90% dos casos ocorrem nas áreas rurais e urbanas pobres de Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil. A LV atinge atualmente 19 estados brasileiros, sendo encontrada principalmente na região Nordeste, onde se concentram 87% dos casos. Observa-se que, nos últimos anos, a letalidade da LV aumentou gradativamente, passando de 3,6% no ano de 1994 para 6,7% em 2003, o que representa um incremento de 85% [Ministério da Saúde, 2006].

Cerca de 90% dos casos de LC ocorrem em 7 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria [Desjeux, 2004]. No Brasil, os casos de LC aumentaram entre 1982 e 2002, oscilando entre 4,75 e 22,94 pessoas infectadas a cada 100.000 habitantes. Houve também uma expansão geográfica desta doença, que em 2002 já se encontrava em todos os estados do país [Ministério da Saúde, 2004, <http://portal.saude.gov.br/saude/>]. As espécies *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis* são as principais responsáveis pelas manifestações clínicas da LC no Brasil. O parasita *L. (L.) amazonensis* pode ser encontrado por toda a bacia amazônica, Maranhão, Ceará, Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo [Neves et al., 2000], e embora primariamente cause LC, já foi encontrado causando um amplo espectro de formas clínicas, incluindo LCD e LV [Barral et al., 1986, Bittencourt et al., 1989, Barral et al., 1991]. No mundo, *L. (L.) major* é a responsável por causar a LC zoonótica ou úmida, afetando roedores e humanos nas áreas áridas e semi-áridas das regiões Oriental, Etiópica e Paleártica. *L. (L.) donovani* causa a LV e ocorre na África Oriental, Índia e China [Neves, 2003].

Há uma íntima relação entre a leishmaniose e os fatores sócio-econômicos das regiões onde elas ocorrem. Políticas inadequadas de saúde e saneamento básico e a urbanização descontrolada são fatores que favorecem o contato humano com os diferentes tipos de inseto-vetor [Arias et al., 1996]. A OMS considera a leishmaniose como doença de categoria I, onde se enquadram doenças emergentes e ainda não controladas como a dengue e as tripanossomíases africanas. Essa organização vem incentivando estudos em busca do descobrimento de novos alvos parasita-específicos para o desenvolvimento de vacinas e drogas para a erradicação das leishmanioses.

1.2.3. Co-infecção *Leishmania*/HIV

A imunossupressão, conferida pela destruição dos linfócitos T CD4+ durante a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), causa uma drástica diminuição da resposta imune do hospedeiro que deveria ser gerada contra *Leishmania*. Devido a esta depressão do sistema imune, os pacientes co-infectados apresentam lesões com localizações atípicas dos parasitas, e

frequentemente ocorre um alto índice de falsos negativos nos testes diagnósticos [Cruz et al., 2006]. Além disso, a infecção com *Leishmania* leva a uma ativação crônica do sistema imune do hospedeiro, o que aumenta a replicação do vírus HIV e diminui o tempo de vida do paciente [Cruz et al., 2006]. Além disso, já foi demonstrado que os lipofosfoglicanos (LPGs) presentes na superfície dos parasitas da espécie *L. infantum* podem induzir a expressão do vírus HIV em células mononucleadas do sangue periférico que se encontram infectadas de modo latente [Bernier et al., 1995], e que isso deve-se provavelmente à secreção de TNF- α [Folks et al., 1989]. A co-infecção também causa uma baixa resposta do paciente às terapias atuais contra a leishmaniose e ajuda o reaparecimento da doença em pacientes que já haviam sido tratados [Cruz et al., 2006].

A OMS estima que 17 milhões de pessoas estejam infectadas pelo vírus HIV em todo o mundo e que um terço dessas pessoas vive em zonas endêmicas da leishmaniose [WHO, 1995]. O crescimento acelerado dos casos de AIDS/HIV durante os últimos 20 anos modificou o espectro das leishmanioses nos campos clínico e epidemiológico [Cruz et al., 2006] e a co-infecção *Leishmania*/HIV é atualmente um caso muito grave de saúde pública. Desde a década de 1980, quando foi publicado o primeiro caso de leishmaniose associada à infecção com o HIV, houve um aumento do número de casos registrados: atualmente os casos já foram detectados em 35 países [Cruz et al., 2006]. O aumento no número de casos de co-infecção é devido à sobreposição entre a epidemia de AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida), basicamente de transmissão urbana, e as áreas onde a leishmaniose é endêmica, fundamentalmente de transmissão rural. Mudanças na epidemiologia da doença, como o aumento da população em áreas suburbanas onde o vetor e o reservatório co-existem, têm aumentado essa sobreposição. Atualmente, a maior prevalência da co-infecção *Leishmania*/HIV tem ocorrido na região do Mediterrâneo. Dos mais de 2.000 casos notificados para a OMS, 90% deles ocorreram na Espanha, Itália, França e Portugal. Nesses países, entre 25-70% de todos os casos de LV estão associados com a infecção pelo HIV, e estima-se que até 1,5-9% dos pacientes de AIDS sofrem de algum tipo de leishmaniose, seja como infecção nova ou como uma recidiva de uma infecção latente [Cruz et al., 2006]. A maioria dos casos de co-infecção registrados na América do Sul acontece no Brasil, onde a incidência de AIDS tem aumentado de 0,8 casos a cada 100.000

habitantes em 1986 para 12,3 casos em 2001 [Sampaio et al., 2002, Rabello et al., 2003]. A Figura 5 ilustra a distribuição geográfica dos casos de co-infecção *Leishmania*/HIV pelo mundo.

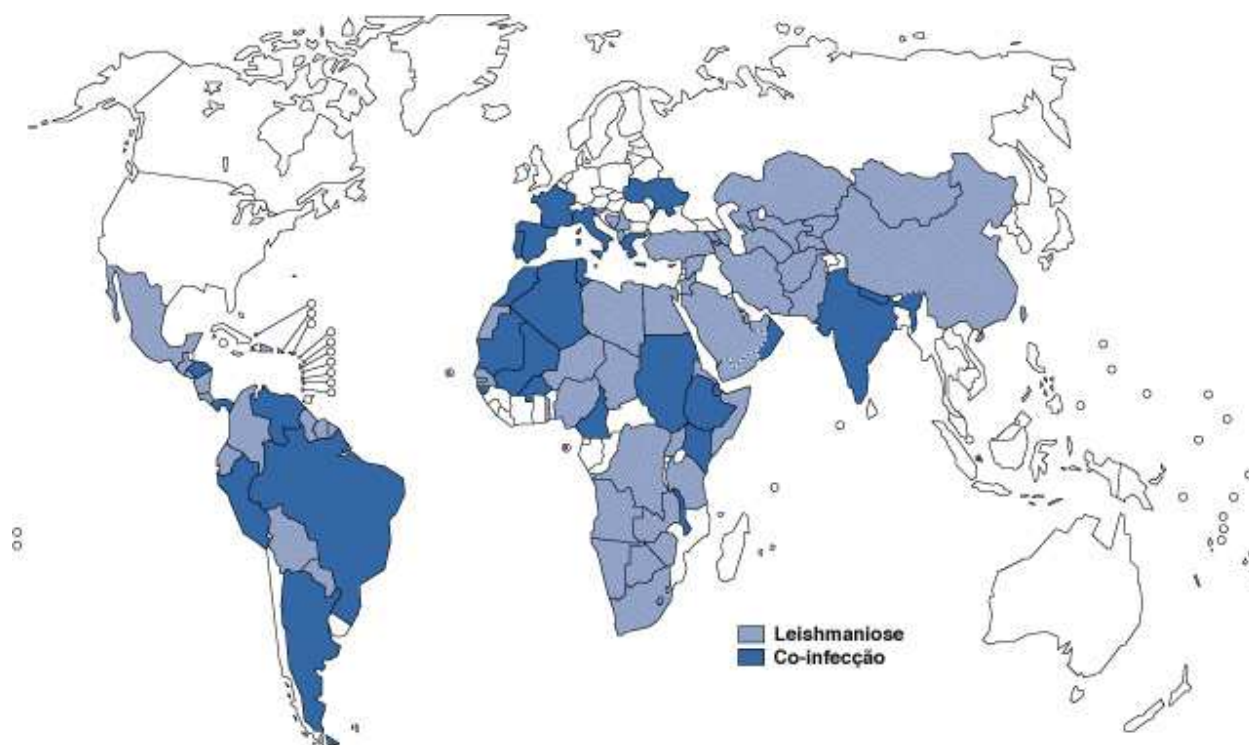


Figura 5 – Distribuição geográfica da leishmaniose e da co-infecção *Leishmania*/HIV no mundo [http://www.who.int/csr/resources/publications/CSR_ISR_2000_1leish/en/index.html]. Em azul claro, os países onde a leishmaniose é endêmica, e em azul escuro, os países onde já foram registrados casos de co-infecção *Leishmania*/ HIV.

1.2.4. Tratamentos disponíveis para as diferentes formas clínicas da leishmaniose

Não existem vacinas para nenhum tipo de leishmaniose e a quimioterapia tem sido inadequada e de alto custo [Croft e Yardley, 2002].

O composto tradicionalmente empregado para combater as leishmanioses, o antimonial pentavalente, frequentemente causa graves efeitos colaterais nos pacientes e acabou selecionando parasitas tolerantes a altas concentrações da droga [Olliaro et al., 2005]. Se a primeira tentativa com o antimonial falhar, várias outras drogas podem ser então administradas, dependendo da espécie de *Leishmania* infectante. O tratamento secundário mais recomendado utiliza o composto anfotericina B, que é altamente ativo, mas também apresenta extensivas complicações tóxicas. A

pentamidina e a paromomicina são utilizadas em alguns casos [Croft e Yardley, 2002]. A miltefosina é a primeira droga oral efetiva contra a leishmaniose, sem efeitos colaterais e com taxas de cura de aproximadamente 98%, sendo eficaz até mesmo no tratamento de co-infecções com o vírus HIV [Schraner et al., 2005]. Como pode ser administrada oralmente, tem potencial para ser utilizada como uma simples e acessível ferramenta de saúde pública para tratar pacientes diretamente nas comunidades, até mesmo durante epidemias [Revista TDR news, nº 68, junho de 2002]. Apesar dessas qualidades, Soto e colaboradores [2004] demonstraram recentemente que a miltefosina não foi eficiente na cura de pacientes com leishmaniose causada por *L. braziliensis* na Guatemala.

A busca pelo descobrimento de novos alvos parasita-específicos para o desenvolvimento de vacinas e drogas eficazes contra todas as espécies de *Leishmania* ainda é bastante urgente e deve ser o principal caminho para a erradicação da doença.

1.3. Organização genômica de *Leishmania* spp.

Os parasitas do gênero *Leishmania* são taxonomicamente primitivos, diplóides e apresentam ciclo de vida assexuado. O genoma nuclear haplóide desses parasitas apresenta 23-36 pares de cromossomos (0,3-2,8 Mb cada) totalizando ~33 Mb [Ivens et al., 2005]. O cariótipo de *Leishmania* é conservado entre as espécies e os genes são sintênicos, apesar de espécies do Velho Mundo apresentarem 36 cromossomos enquanto as espécies do Novo Mundo apresentam 35 (complexo *L. braziliensis*) ou 34 (complexo *L. mexicana*) cromossomos [Wincker et al., 1996]. Há um significativo polimorfismo quanto ao tamanho de determinados cromossomos entre as diferentes espécies de *Leishmania*. Também há evidências de variação no número de cromossomos com seqüências homólogas, o que indica uma certa plasticidade na organização dos genes nos cromossomos e pode ter implicações na evolução das várias cepas e espécies existentes [Wirth, 1990].

Além do DNA nuclear, os parasitas do gênero *Leishmania* possuem um DNA mitocondrial pouco usual, chamado de kDNA que compreende de 10-15% do DNA total da célula. Ele é composto de dois tipos de moléculas circulares de DNA: os maxicírculos (20.000 bp de comprimento), que são o DNA mitocondrial propriamente dito, e os minicírculos (800 a 1200 bp), que não apresentam nenhuma função codificadora [Neves, 2003].

Recentemente, foi finalizado o seqüenciamento do genoma do parasita *L. major* por um consórcio de pesquisadores [Ivens et al., 2005]. Eles verificaram que o genoma de *Leishmania* é rico em resíduos do tipo GC (~60%) e está representado por seqüências repetitivas [Wirth, 1990, Johnston et al., 1999, Wickstead et al., 2003, Ivens et al., 2005]. As seqüências que codificam genes não possuem íntrons e podem estar representadas em cópia simples, dupla, ou repetidas em *tandem*. São ao todo 911 genes codificadores de RNA, 39 pseudogenes e 8272 genes codificadores de proteínas, dos quais 36% podem ser relacionados a uma função predita. Entre estes genes, incluem-se aqueles envolvidos nas interações hospedeiro-patógeno, como de enzimas proteolíticas, e na extensiva maquinaria para a síntese dos complexos glicoprotéicos de superfície [Ivens et al., 2005]. As seqüências intergênicas exibem consideráveis divergências, mesmo entre genes intimamente correlacionados [Stiles et al., 1999, Ivens et al., 2005]. A variabilidade genética deve-se principalmente à ocorrência de mutações, mas eventos de formação de híbridos, amplificação/deleção gênica e possível troca de material genético entre organismos também já foram descritos [Grimaldi e Tesh, 1993].

Como características peculiares, os organismos deste gênero apresentam *trans*-splicing do RNA mensageiro, edição dos RNAs mitocondriais, duplicação gênica e transcrição policistrônica dos genes [Stiles et al., 1999]. Os genes codificadores de proteínas estão organizados em agrupamentos policistrônicos longos que se localizam em uma fita específica, e os únicos fatores de transcrição já identificados nesses organismos atuam durante a síntese do RNA “spliced-leader” [Schimanski et al., 2005a]. Aproximadamente 8-10 mil genes são expressos, os quais estão organizados em grupos de ligação cromossomal bastante conservados entre as espécies [Wirth, 1990]. Verificou-se ainda que o genoma de *L. major* codifica inúmeras proteínas ligantes de RNA, o que é consistente com a regulação pós-transcricional da expressão gênica nesses parasitas [Ivens et al., 2005].

1.4. Telômeros

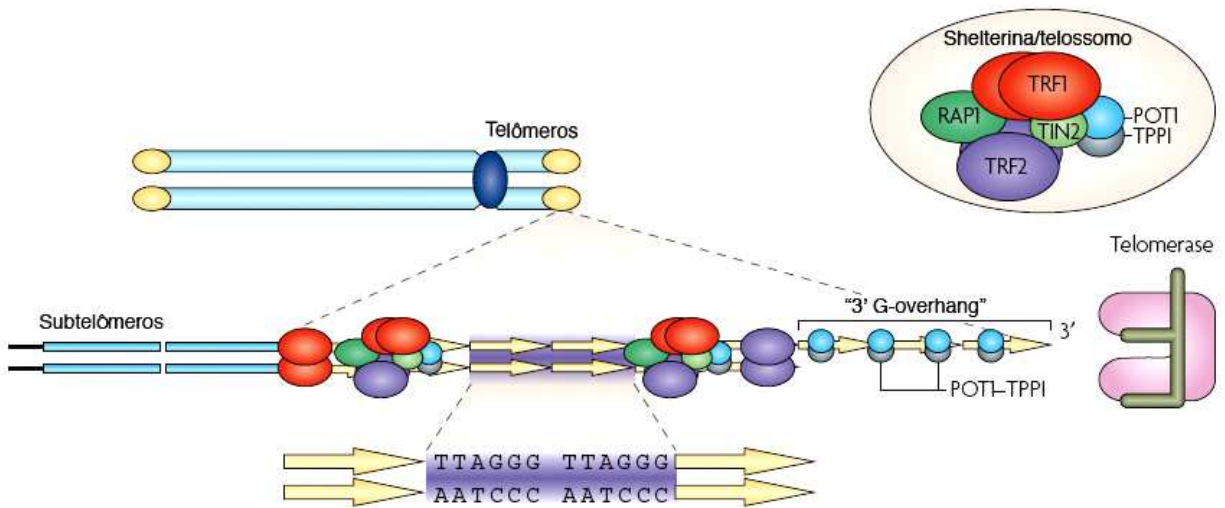
1.4.1. Características gerais

Telômeros são as extremidades físicas dos cromossomos lineares e são formados por DNA e proteínas. A principal função dos telômeros é proteger esses cromossomos de degradação

por exonucleases e de fusões terminais, mantendo a integridade genômica e a viabilidade celular, além de garantir a completa replicação do genoma [de Lange, 2002, Jonsson et al., 2002]. Assim, os telômeros previnem ou controlam pelo menos quatro processos bioquímicos distintos que ocorrem no DNA telomérico *in vivo*: (1) fusão com outro telômero ou extremidade de DNA; (2) replicação das seqüências teloméricas pela telomerase; (3) degradação do DNA telomérico; e (4) recombinação nos telômeros ou em suas adjacências. Esses controles atuam para manter os telômeros funcionalmente protegidos [Blackburn, 2001].

Normalmente, os telômeros são compostos de repetições simples de nucleotídeos dispostas em *tandem* e de um conjunto de proteínas associadas, que são responsáveis por ajudar no processo da replicação do DNA e por proteger as extremidades dos cromossomos como uma estrutura em forma de capa (“cap”) (Figuras 6A e 6B) [Blackburn, 2001]. Além disso, em humanos, tanto os subtelômeros (regiões adjacentes aos telômeros) quanto os telômeros contêm nucleossomos, e estes apresentam um espaçamento alterado quando são comparados com a cromatina não telomérica [Tommerup et al., 1994, revisado em Blasco, 2007]. A shelterina, ou telossomo, é um exemplo de complexo telomérico formado por 6 proteínas telômero-específicas que se associam com os telômeros humanos, protegendo-os de degradações e fusões terminais [de Lange, 2005]. As Figuras 6A e 6B ilustram a estrutura da região telomérica de mamíferos e leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.

A) Mamíferos



B) *S. cerevisiae*

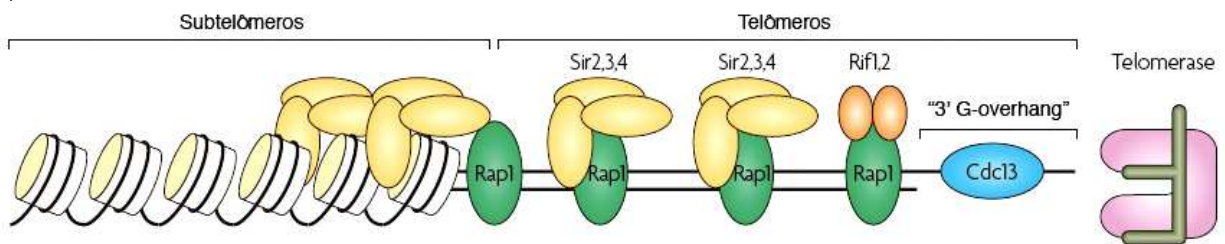


Figura 6 – Estrutura dos telômeros e dos subtélômeros em mamíferos e *S. cerevisiae* [Blasco, 2007]. A) Telômeros de mamíferos. Repetições teloméricas dupla-fita encontram-se associadas a um complexo multiprotéico denominado “shelterina” ou “telossomo”, formado essencialmente pelas proteínas TRF1 e TRF2, TIN2, RAP1, POT1 e TPP1. Quando os telômeros se apresentam em estrutura aberta (como mostrado no diagrama), o terminal “3’ G-overhang” aparece associado ao heterodímero POT1-TPP1, que recruta a telomerase para os terminais do cromossomo. B) Telômeros de *S. cerevisiae*. Repetições teloméricas dupla-fita encontram-se associadas à proteína RAP1, que por sua vez recruta as proteínas SIR2, SIR3 e SIR4, RIF1 e RIF2, que funcionam como seus fatores regulatórios. Quando os telômeros se apresentam em estrutura aberta (como mostrado no diagrama), o terminal “3’ G-overhang” aparece associado à proteína CDC13 que recruta a telomerase para os terminais do cromossomo.

Os telômeros são formados por DNA nas formas de dupla-fita (uma fita rica em G e outra rica em C) e de simples-fita, rica em resíduos do tipo G [Chan e Blackburn, 2004, Blackburn, 2005]. Esta última forma uma protrusão em direção à extremidade cromossômica que é conhecida como “3’ G-overhang” [Henderson e Blackburn, 1993, Wright et al., 1997], e a sua presença é conservada desde eucariotos unicelulares até vertebrados superiores [Myler et al., 2000]. Este terminal simples-fita é capaz de assumir estruturas fechadas que são responsáveis por

proteger a extremidade dos telômeros contra a maquinaria de reparo da célula e por regular o acesso da telomerase [Myler et al., 2000, Dmitriev et al., 2003, Blackburn, 2005, de Lange, 2005]. Uma dessas estruturas é o G-quadruplex, que é formado pelo “empilhamento” de tétrades de guanidina, sendo regulado pelas proteínas que se associam à simples-fita telomérica, como a POT1 e a CDC13 (Figuras 7A e 7B) [Fang e Cech, 1993, Zaugg et al., 2005, Baird e Farr, 2006, Salas et al., 2006]. Outra estrutura possível é o “T-loop”, ou “loop” do telômero (Figura 7C). Os “T-loops” são estabilizados por proteínas e originados pela invasão da região simples-fita na porção dupla-fita do telômero e pela interação da porção dupla fita com proteínas teloméricas [de Lange, 2004]. Amiard e colaboradores [2007] propuseram recentemente um novo modelo topológico na formação do “T-loop” e na homeostase dos telômeros. Eles sugerem que a proteína TRF2 gera um espiral positivo e condensa o DNA dupla-fita em volta de si, levando o DNA circunvizinho a se afrouxar e assim favorecendo a invasão da simples-fita [Amiard et al., 2007]. A formação de uma ou ambas estruturas já foi observada em células de mamíferos, ciliados e tripanossomatídeos [Griffith et al., 1999, Murti e Prescott, 1999, Muñoz-Jordan et al., 2001, de Lange, 2004].

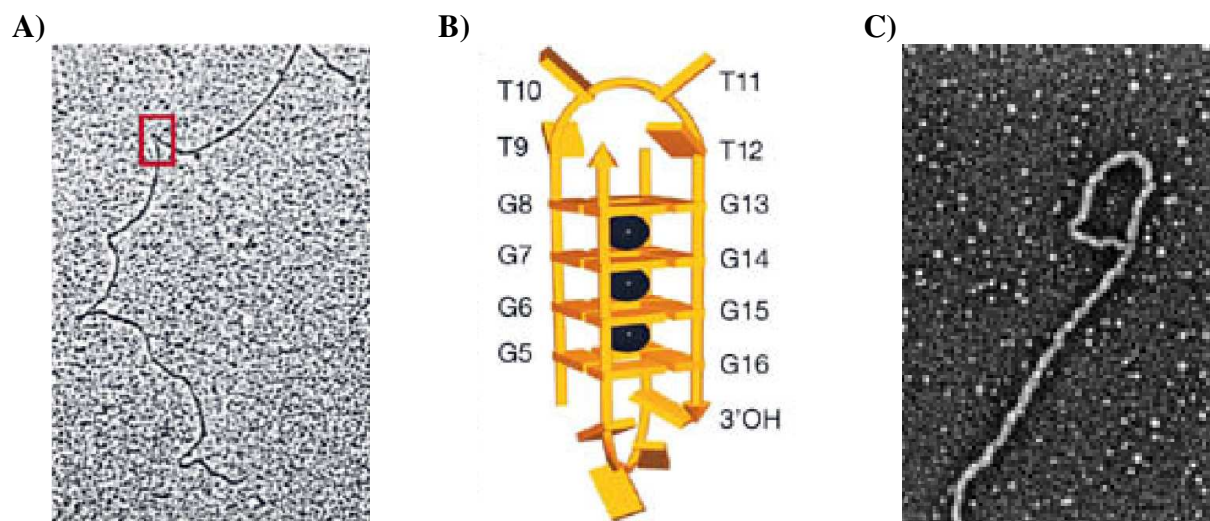


Figura 7 - Estruturas formadas pelo DNA telomérico [Baird e Farr, 2006, Muñoz-Jordán et al., 2001]. A) Microscopia eletrônica das interações teloméricas na forma de G-quadruplex. **B)** Esquema de uma estrutura G-quadruplex antiparalela e dois “3’ G-overhangs” (em amarelo). Em preto, estão representados cátions que têm a função de estabilizar a estrutura. **C)** Visualização de uma estrutura em forma de “T-loop” de *Trypanosoma brucei*.

As regiões teloméricas podem ser longas, como em humanos e alguns protozoários parasitas [Makarov et al., 1997, Fu e Melville, 2002], ou apresentar somente poucas centenas de bases, como em leveduras, ciliados e *Leishmania* [Larson et al., 1987, Wellinger et al, 1993, Conte e Cano, 2005]. Essa variação quanto ao comprimento ocorre devido a inúmeros eventos de expansão e contração dos telômeros, o que ocorre até mesmo entre cromossomos de uma mesma célula [revisado em Barry et al., 2003].

Adjacentes aos telômeros encontram-se os subtelômeros, os quais são bastante divergentes entre os organismos [Henderson, 1995] e compõem-se por seqüências degeneradas de repetições teloméricas, por outras repetições diversas, por pseudogenes e até por alguns genes intactos em alguns parasitas [Chiurillo et al, 1999, Cano, 2001, Conte e Cano, 2005, Barry et al., 2003].

1.4.2. Telômeros de *Leishmania* spp.: organização e estrutura

Os telômeros de tripanossomatídeos compartilham algumas características conservadas com os telômeros de outros eucariotos, como a seqüência repetitiva 5'-TTAGGG-3' encontrada nos vertebrados, a heterogeneidade do comprimento telomérico entre os diferentes cromossomos de uma mesma célula e entre diferentes espécies, e a presença do terminal simples-fita "3' G-overhang" nas extremidades cromossômicas [Pryde et al., 1997, Fu e Barker, 1998, Chiurillo et al., 1999, Cano, 2001, Conte e Cano, 2005]. Em *Leishmania*, os telômeros são constituídos de repetições em *tandem* de seqüências de 6 pb do tipo 5' -TTAGGG- 3' [Chiurillo et al, 1999, Blackburn e Challoner, 1984] idênticas às encontradas em humanos [Moyzis et al., 1988]. Em *L. braziliensis*, além das seqüências 5' -TTAGGG- 3', também são encontradas repetições teloméricas do tipo 5' -TCCACGGGTTAGGG- 3' [Fu e Barker, 1998; Fu et al., 1998]. Em *L. amazonensis*, os telômeros também são polimórficos e variam em tamanho entre 0,2 e 1,0 kb e estima-se que o tamanho do terminal "3' G-overhang" seja de 12 nucleotídeos [Conte e Cano, 2005].

Nas vizinhanças das repetições teloméricas, encontram-se subtelômeros altamente dinâmicos e polimórficos [Pryde et al., 1997, Fu e Barker, 1998, Chiurillo et al., 1999, Chiurillo et al., 2000, Conte e Cano, 2005, Dobson et al., 2006]. Em *Leishmania*, os subtelômeros são conhecidos como LCTAS ("*Leishmania* conserved telomere-associated sequences") e consistem de seqüências de DNA curtas e repetitivas que diferem bastante em organização e tamanho,

dependendo do cromossomo e da espécie [Fu e Barker, 1998, Chiurillo et al., 2000, Conte e Cano, 2005]. Além disso, estudos indicam que além de apresentar um alto grau de polimorfismo, essas seqüências também são responsáveis por eventos de recombinação freqüentes [Myler et al., 1999]. Outros elementos subteloméricos não conservados também ocorrem em *Leishmania*. Em *L. major*, a apenas ~ 5 kb dos telômeros, são expressos alguns genes codificadores de LPGs do tipo beta-galactosiltransferases de cadeia lateral, que são responsáveis por modificações do parasita durante a diferenciação celular no tubo digestivo do inseto vetor [Dobson et al., 2006]. Embora esse mecanismo de variação de LPGs seja muito diferente da sofisticada variação antigênica utilizada por *Trypanosoma brucei* para prevenir a imunidade adquirida do hospedeiro [Vanhamme et al., 2001], em ambos os casos a sobrevivência do parasita depende diretamente do repertório genético dos seus antígenos de superfície e a região subtelomérica é o ambiente ideal para fornecer esta variabilidade genética por causa dos seus constantes eventos de recombinação.

Nos tripanossomatídeos, existem poucos dados sobre proteínas ligantes de telômeros [Cano, 2001, Cano et al., 2002, Fernández et al., 2004, Siqueira-Neto et al., 2007, Lira et al., 2007a, Lira et al., 2007c], mas assim como nos vertebrados, sabe-se que os complexos de proteínas que se associam aos seus telômeros são evolutivamente conservados [Dreesen et al., 2007]. Em *T. brucei*, três proteínas que formam complexos com o DNA telomérico rico em G (complexos C1 a C3) foram co-purificados com a atividade de telomerase e podem formar um complexo multiprotéico [Cano et al., 2002]. Em *L. amazonensis*, Fernández e colaboradores [2004] identificaram e caracterizaram alguns componentes da cromatina telomérica que se associam à simples-fita rica em G. Dois complexos de DNA-proteína, denominados LaGT2 e LaGT3, foram respectivamente identificados como homólogos à proteína RBP38, que estabiliza RNAs mitocondriais em organismos Kinetoplastida [Sbicego et al., 2003], e à proteína RPA-1, conservada em todos os organismos eucariotos. Há ainda um terceiro complexo, denominado LaGT1, que é composto por uma proteína de aproximadamente 14 kDa ainda desconhecida. Foram identificados também dois complexos protéicos que interagem com a seqüência telomérica dupla-fita, os quais são denominados LaTAF [Lira et al., 2007a] e LaTBP1 (que compartilha domínios estruturais com a proteína telomérica RAP1 de leveduras) [Lira et al., 2007c]. Recentemente, Li e colaboradores [2005] identificaram homólogos da proteína TRF2 nos genomas de *T. brucei*, *Trypanosoma cruzi* e de *L. major*. Assim como a TRF2 de mamíferos,

a TRF2 de *T. brucei* (TbTRF2) interage com o DNA telomérico na forma de um homodímero e é essencial para a manutenção do terminal telomérico “3’ G-overhang” [Li et al., 2005]. Sabe-se também que o heterodímero Ku70/80 é essencial para a manutenção dos telômeros em tripanossomatídeos, provavelmente devido a sua habilidade conservada de recrutar a telomerase [Conway et al., 2002, Janzen et al., 2004]. Prova disso é que em parasitas *T. brucei* deficientes para a proteína Ku80, assim como nos parasitas telomerase-deficientes, os telômeros são gradualmente encurtados até atingirem um tamanho crítico e então permanecem inalterados [Janzen et al., 2004, Dreesen et al., 2005].

Na tabela 1, encontra-se um quadro resumo contendo as proteínas que se ligam aos telômeros de tripanossomatídeos [adaptado de Lira et al., 2007b].

Tabela 1:

Proteínas de Tripanossomatídeos	Similaridades de sequência/ domínio de ligação ao DNA	Função/conservação das proteínas
Proteínas que interagem com o DNA telomérico simples-fita rico em G		
TERT	Compartilha similaridades de sequência com outras TERTs dentro dos motivos canônicos.	Identificada <i>in silico</i> . Há atividade de telomerase em três espécies de tripanossomatídeos.
Complexos C1, C2 e C3	Componentes protéicos ainda não identificados.	Purificados por cromatografia de afinidade, ligam-se ao DNA telomérico <i>in vitro</i> .
RPA-1	Compartilha similaridades de sequência com outras RPA-1 e contém os domínios “OB fold” e RFA-1.	Purificada por cromatografia de afinidade, liga-se ao DNA telomérico <i>in vitro</i> e está envolvida na replicação do DNA.
RBP38	Não há similaridades de sequência com nenhuma proteína ou domínios protéicos de eucariotos superiores.	Purificada por cromatografia de afinidade, liga-se aos telômeros, a DNAs ricos em GT e ao kDNA <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Está implicada na estabilização do RNA mitocondrial e na replicação do kDNA.

Proteínas que interagem com o DNA telomérico dupla-fita		
TRF2	Contém um domínio do tipo Myb e compartilha baixas similaridades de seqüência com o domínio N-terminal de homodimerização da TRF2 de humanos.	Identificada <i>in silico</i> , sua função telomérica já foi confirmada <i>in vivo</i> . Liga-se ao DNA como um homodímero e é essencial na manutenção do terminal “3’ G-overhang”.
Proteínas que atuam no reparo e na recombinação do DNA		
Complexo Ku70/80	Compartilha similaridades de seqüência com outras Ku70 e Ku80.	Identificado <i>in silico</i> , sua função telomérica já foi confirmada <i>in vivo</i> . É importante para a manutenção dos telômeros e não está envolvido no reparo de quebras em dupla-fita ou na expressão de VSGs.

A função dos telômeros em *Leishmania* ainda é pouco conhecida, mas sabe-se que à semelhança dos telômeros dos outros tripanossomatídeos e da maioria dos eucariotos, eles são mantidos pela ação da ribonucleoproteína telomerase [Cano et al., 1999, Giardini et al., 2006].

A Figura 8 mostra o panorama atual da cromatina telomérica dos tripanossomatídeos, mostrando todas as proteínas que interagem tanto com a região dupla-fita (TRF2 e Ku70/80), quanto com a simples-fita telomérica (Rbp38, Rpa-1, C1-C3 e telomerase).

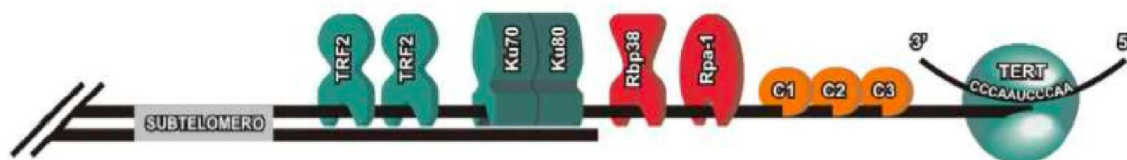


Figura 8 – Panorama atual da cromatina telomérica nos tripanossomatídeos [Lira et al., 2007b, *in press*]. Representação do terminal cromossômico dos tripanossomatídeos mostrando a localização telomérica de algumas das proteínas que apresentam funções conhecidas (verde), hipotéticas (vermelho) ou desconhecidas (laranja). Nesta Figura está representada uma extremidade de cromossomo do parasita e as proteínas que se associam *in vitro* à simples-fita rica em G (Rbp38, Rpa-1, C1-C3 e telomerase) e à dupla-fita telomérica (TRF2 e Ku70/80). A seqüência telomérica TTAGGG está em preto e a região subtelomérica do cromossomo está em cinza.

1.4.3. A replicação dos telômeros

A incapacidade das DNA polimerases convencionais de sintetizar completamente uma das fitas do DNA parental gera um problema na finalização da replicação do DNA nas extremidades cromossômicas. Isso acontece porque as DNAs polimerases necessitam de uma extremidade 3'OH livre para adicionarem o próximo nucleotídeo e atuam sempre no sentido 5' para 3'. Ao final de cada evento de replicação, os iniciadores de RNA que fornecem esse terminal 3'OH livre no terminal da fita descontínua são removidos, deixando um espaço não preenchido na extremidade 5' e acarretando a perda de seqüência telomérica a cada novo evento de replicação. Para que não haja a perda de seqüências importantes para o genoma, os eucariotos desenvolveram vários mecanismos capazes de estender os telômeros, como a replicação pelas telomerasas e os eventos de recombinação homóloga [Alberts et al., 2004, Ohki et al., 2005]. A Figura 9 mostra um esquema do processo de replicação das extremidades cromossômicas e evidencia o problema da replicação do DNA.

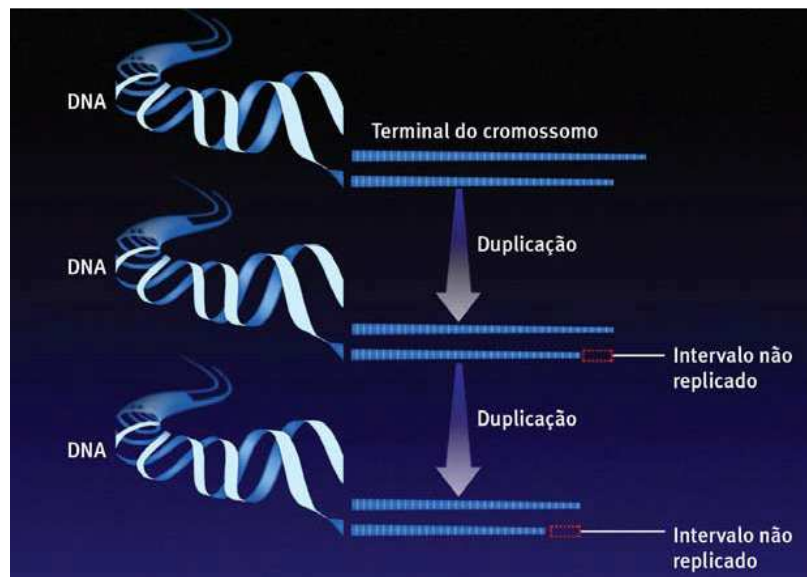


Figura 9 - O problema da replicação do DNA [Cano, 2006]. A fita que é sintetizada de forma descontínua fica mais curta a cada divisão celular, pois as DNAs polimerases convencionais não conseguem finalizar a sua síntese. Isso ocorre porque a remoção do iniciador de RNA localizado no terminal 5' da fita descontínua deixa um espaço não preenchido (retângulo em vermelho) que não é copiado nas próximas replicações.

Além da telomerase, que é o principal mecanismo de manutenção dos telômeros, existem mecanismos alternativos que são ativados para manter os telômeros na ausência da telomerase. Estes mecanismos baseiam-se em eventos de recombinação que amplificam ou rearranjam seqüências já existentes nos telômeros [Teng e Zakian, 1999, Hensen et al., 2000] e parecem agir como acessórios tanto para os métodos baseados na telomerase, quanto para os que se baseiam na retrotransposição [Pardue e DeBaryshe, 2003]. Eles foram descritos pela primeira vez em raros sobreviventes espontâneos em populações de leveduras que estavam em processo de senescência após a perda da telomerase [Lundblad e Blackburn, 1993, Teng e Zakian, 1999]. O mosquito *Anopheles gambiae* e a mosca *Drosophila melanogaster* são exemplos de organismos que realizam o processo de recombinação [Roth et al., 1997, Pardue e DeBaryshe, 2003]. Em *Drosophila*, por exemplo, não há telomerase e as suas repetições teloméricas são constituídas de longas repetições em *tandem* de dois retrotransposons do tipo não-LTR chamados *HeT-A* e *TART*, os primeiros elementos transponíveis com um papel genuíno na estrutura celular [Pardue e DeBaryshe, 2003].

Em *T. brucei*, existe um mecanismo ainda desconhecido que é responsável por estabilizar os telômeros criticamente curtos após a deleção o gene TERT. Os telômeros curtos, transcricionalmente inativos, encurtam-se progressivamente sem causar senescência e são estabilizados na ausência da telomerase [Dreesen e Cross, 2006a, Dreesen e Cross, 2006b, Dreesen et al., 2007].

Na maioria dos cânceres, o tamanho dos telômeros é mantido pela telomerase [Shay e Bacchetti, 1997], porém cerca de 5-10% das células tumorais mantêm os seus telômeros utilizando um ou mais mecanismos alternativos chamados ALT (“alternative lengthening of telomeres”) [Reddel, 2003]. Parece que a fita de DNA de um telômero de uma célula ALT pareia-se com a fita complementar de um outro telômero, e por recombinação homóloga troca DNA telomérico utilizando esta fita complementar como molde [Dunham et al., 2000]. De maneira similar, células imortalizadas *in vitro* também fazem uso da telomerase [Counter et al., 1992] ou do mecanismo ALT [Bryan et al., 1995].

1.5. Telomerase

1.5.1. Características gerais: estrutura, função e atividade enzimática

A telomerase é um complexo ribonucleoprotéico (RNP) que utiliza um molde de RNA intrínseco para sintetizar as repetições teloméricas nos terminais cromossômicos [Greider e Blackburn, 1985]. A telomerase é quase que universalmente conservada em eucariotos. Ela é composta por uma subunidade catalítica, constituída por um componente protéico semelhante a uma transcriptase reversa (TERT), por uma subunidade estrutural, constituída pelo componente RNA da telomerase (TER) e por algumas proteínas associadas [Lingner et al., 1997b, Harrington et al., 1997, revisado em Autexier e Lue, 2006].

O enovelamento do sítio ativo das telomerases é similar ao das RTs retrovirais. A estrutura de uma RT é normalmente descrita como uma mão direita semi-fechada. O polegar é responsável por contactar e estabilizar o complexo entre o oligonucleotídeo de DNA e o molde do RNA, a palma contém o sítio ativo com os seus dois íons de metal e os dedos encerram junto com a palma o nucleotídeo que vai ser incorporado na molécula nascente de DNA (Figura 10) [Cristofari e Lingner, 2003].

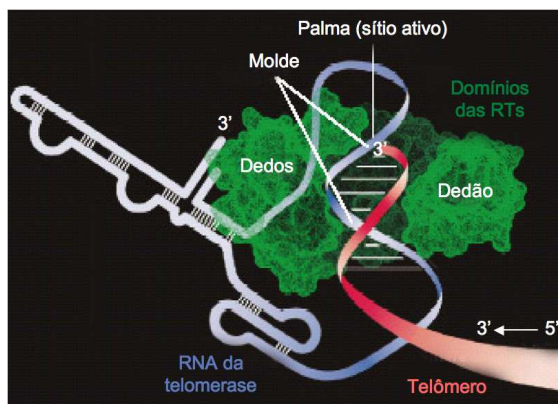


Figura 10 – Modelo da enzima telomerase proposto por Lingner et al. [1997a]. A subunidade catalítica (verde) baseia-se no modelo da mão direita da transcriptase reversa do vírus HIV-1 [Kohlstaedt et al., 1992]. O polegar e os dedos estão voltados para a região anterior. Os motivos A, B', C e D estão localizados na palma e os aspartatos do sítio ativo estão próximos da extremidade 3' do DNA telomérico (vermelho). A subunidade RNA (azul) posiciona o molde na região da palma; a localização do resto do RNA está representada esquematicamente na forma de sua estrutura secundária [Lingner et al., 1994]. Subunidades protéicas adicionais podem estar associadas (dados não mostrados). O DNA telomérico está mostrado pareando, mas não entrelaçado com a subunidade RNA.

A maioria dos organismos utiliza a telomerase para replicar os seus terminais cromossômicos. Sua atividade já foi detectada em extratos protéicos de ciliados [Greider and Blackburn, 1985], vertebrados [Morin, 1989], leveduras [Cohn e Blackburn, 1995], plantas [McKnight et al., 1997], nemátodos [Magenat et al., 1999], insetos [Sasaki e Fugiwara, 2000] e protozoários [Cano et al., 1999, Muñoz e Collins, 2004, Giardini et al., em preparação]. Sabe-se que a telomerase é normalmente ativa em organismos unicelulares, já que é requerida para a proliferação indefinida da população celular. Na maioria dos organismos multicelulares, porém, esta enzima não é expressa de forma constitutiva em todos os estágios de desenvolvimento, nem em todos os tecidos. Em humanos e plantas, por exemplo, a telomerase pode ser facilmente detectada em tumores e em células altamente proliferativas, como as células dos ovários, dos testículos e da medula óssea, sendo fortemente reprimida nas células somáticas normais [Kim et al., 1994, Riha e Shippen, 2003, revisado em Dong et al., 2005]. Contrariamente, em camundongos e galinhas, a atividade de telomerase pode ser detectada em todos os tecidos [Prowse e Greider, 1995, Venkatesan e Price, 1998].

O processo de senescência celular é o destino inevitável das células somáticas replicativas normais. Nessas células, não ocorre a expressão da telomerase e os telômeros, portanto, encurtam-se progressivamente a cada evento de mitose. Quando os telômeros atingem um tamanho muito curto, as células entram em crise (limite de Hayflick, Figura 11) [Shay e Wright, 2000] e ativam vários mecanismos de “checkpoint” de ciclo celular e de reparo do DNA que resultam em fusões terminais, parada do ciclo celular, senescência e/ou apoptose [Shay e Wright, 2000, Shay e Wright, 2002]. Na maioria dos casos, as células se tornam senescentes antes de se tornarem cancerosas, mas se alguma célula conseguir ultrapassar o ponto de crise e continuar se dividindo com os seus telômeros não funcionais e a sua maquinaria de reparo de DNA ativada, isso gerará instabilidade genômica e favorecerá a oncogênese [Shay e Wright, 2002, Shay e Wright, 2007]. A longevidade e a progressão maligna da célula cancerosa depende da expressão da telomerase ou de outros mecanismos que auxiliem-nas a manter uma alta capacidade proliferativa. Assim, em quase todas as células tumorais malignas, ocorre a reativação e a expressão da telomerase em altas quantidades. É por isso que a telomerase continua a ser um alvo muito atraente para o desenvolvimento de novas terapias anti-câncer [Shay e Wright, 2002]. Além disso, os telômeros e a telomerase podem representar prognósticos plausíveis como marcadores de células tumorais [Shin et al., 2006].

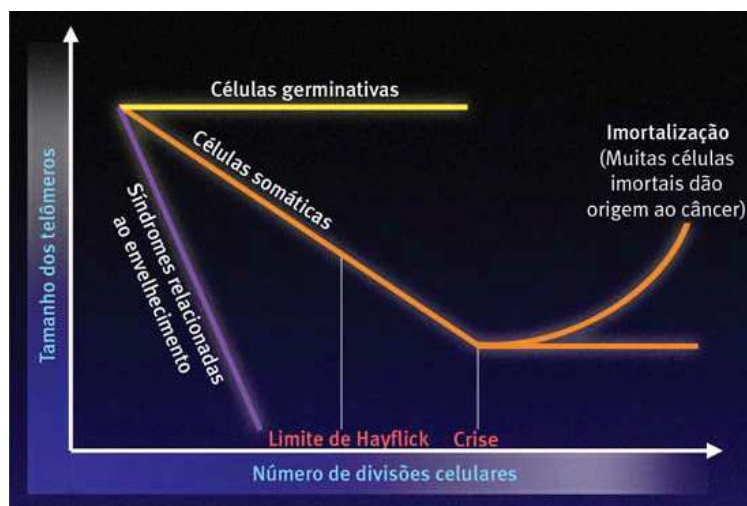


Figura 11 – Relação entre o tamanho dos telômeros e a capacidade de proliferação de diferentes tipos celulares [revisado por Shay e Wright, 2000, ilustração de Cano, 2006]. Este gráfico mostra que células germinativas (não diferenciadas – linha amarela) têm telômeros longos e multiplicam-se indeterminadamente, e células somáticas (já diferenciadas – linha laranja) dividem-se por 50-60 gerações e perdem seus telômeros gradualmente (o “limite de Hayflick” é o momento em que a maioria das células somáticas mostra sinais de envelhecimento). Células “em crise” que já acumularam diferentes mutações morrem ou reativam a telomerase, tornando-se “imortais”. O encurtamento acelerado dos telômeros (linha roxa) ocorre em muitas síndromes relacionadas ao envelhecimento prematuro.

1.5.2. Composição do complexo holoenzimático da telomerase

Em humanos, apenas os componentes TERT e TER são necessários para assegurar a atividade enzimática *in vitro* [Weinrich et al., 1997, Beattie et al., 1998], embora *in vivo* as proteínas regulatórias associadas também sejam essenciais para a função enzimática [Harrington, 2003]. Propõe-se que pelo menos 32 proteínas distintas se associam com a telomerase humana [revisado em Cohen et al, 2007].

Apesar de evolutivamente distantes, a composição e a estrutura do complexo enzimático das telomerases são bastante conservadas. Sua composição é semelhante desde leveduras até mamíferos, incluindo os humanos (Figura 12) [Chen e Greider, 2004, Smogorzewska e de Lange, 2004, Harrington, 2005]. A função de cada um destes componentes dos complexos holoenzimáticos está descrita adiante.

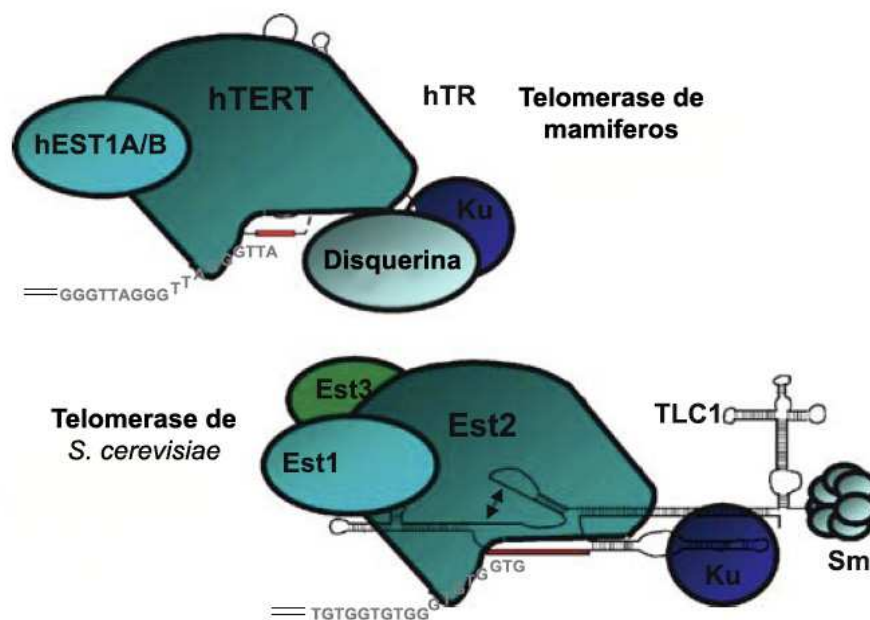


Figura 12 – A composição e a estrutura das telomerases é similar entre leveduras e mamíferos [Harrington, 2005]. Texto em cinza: sequência de DNA telomérico. Linha preta: estrutura secundária dos RNAs das telomerases (hTR em humanos e TLC1 em leveduras) com a sequência do molde indicada por uma linha vermelha. Os componentes protéicos com similaridades na sequência ou na função estão indicados com cores similares. Adaptado de Chen e Greider [2004] e Smogorzewska e de Lange [2004].

1.5.2.1. O componente protéico TERT

O complexo ribonucleoprotéico (RNP) da telomerase foi purificado pela primeira vez em extratos de *Euplotes aediculatus* [Lingner e Cech, 1996]. Um dos polipeptídeos que co-purificaram com a atividade de telomerase foi parcialmente sequenciado por espectrometria de massa. A clonagem e a análise dessa sequência revelaram que a proteína purificada (p123) apresentava homologia com os motivos já conhecidos das RTs e apresentava similaridades com a proteína Est2p de *S. cerevisiae*. Esta proteína de *S. cerevisiae* já tinha sido previamente identificada por seleção genética em mutantes que apresentavam telômeros curtos e fenótipo de senescência e foi reconhecida mais tarde como sendo o componente TERT [Lingner et al., 1997b]. Baseados nas sequências já conhecidas de *E. aediculatus* e *S. cerevisiae*, foram identificados e clonados os genes homólogos de humanos [Harrington et al., 1997], leveduras [Nakamura et al., 1997], camundongos [Greenberg et al., 1998], plantas [Oguchi et al., 1999], protozoários e helmintos [Bryan et al., 1998, Malik et al., 2000, Giardini et al., 2006].

Análises de sequência e de função dos componentes TERT já clonados mostram que eles contêm domínios funcionais que estão distribuídos ao longo da cadeia polipeptídica, e a disposição desses domínios encontra-se ilustrada na Figura 13. Um domínio central do tipo das transcriptases reversas (domínio RT) exibe grupos de conservação de seqüências previamente identificados entre os membros da família das transcriptases reversas (RTs). Esse domínio central contém os motivos 1, 2, A, B', C, D e E [Bryan et al., 1998] e encontra-se flanqueado por uma longa região N-terminal, contendo os motivos GQ, CP e QFP [Friedman e Cech, 1999; Xia et al., 2000] e uma curta região C-terminal. Entre a região N-terminal e os motivos das RTs, há também o motivo T que é telomerase-específico [Bryan et al., 1998] (Figura 13). É interessante notar que entre os componentes TERT já identificados encontra-se o de *Giardia lamblia* (GlTERT), que contém a maioria dos motivos e das características das telomerases já descritas, mas não apresenta o motivo T telomerase-específico. Apesar disso, a identificação de que a telomerase de um dos protozoários parasitas mais antigos evolutivamente é similar às telomerases da maioria dos outros eucariotos, sugere que essa enzima deve ter surgido antes de *G. lamblia*, o eucarioto mais primitivo ainda existente [Malik et al., 2000].

Os domínios das RTs constituem o núcleo catalítico da telomerase, sendo os responsáveis pela sua função enzimática [Bryan et al., 1998]. Comparações entre os domínios das diferentes famílias das RTs levaram à conclusão de que as TERTs são mais proximamente relacionadas com as RTs da família de retrotransposons do tipo não-LTR ("long terminal repeat"), sugerindo a sua antiga origem evolutiva [Eickbush, 1997, Nakamura e Cech, 1998]. Uma das características que distinguem o componente protéico das telomerases das RTs convencionais é a presença de uma grande inserção entre os motivos A e B' (IFD, Figuras 13 e 14). Como estes motivos estão localizados dentro da região da palma e dos dedos, presume-se que esta inserção seja uma elaboração da estrutura dos dedos [Lue et al., 2003]. Outra característica distintiva nas telomerases é a presença de uma longa e básica região amino-terminal [revisado em Autexier e Lue, 2006].

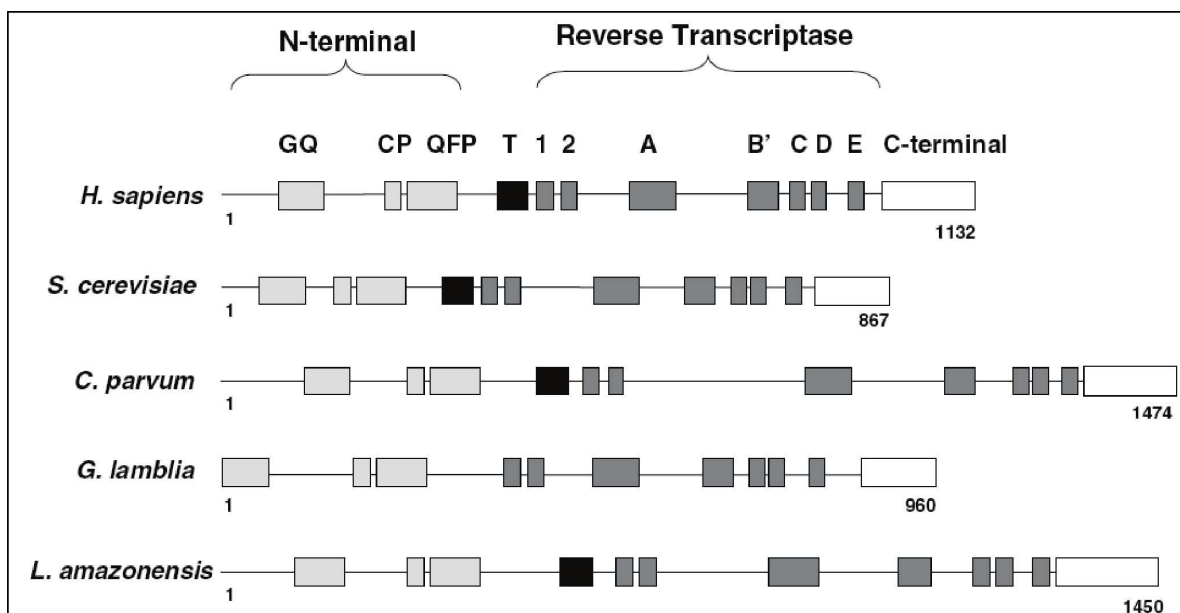


Figura 13 - Esquema comparativo das seqüências TERT [Giardini et al., 2006]. O gene que codifica o componente TERT de *L. amazonensis* contém todos os motivos conservados encontrados em vários organismos filogeneticamente distantes. Motivos conservados de TERT: N-terminal, T, e os motivos das transcriptases reversas 1, 2 e A-E. Os motivos N-terminal e T são telomerase-específicos, enquanto os motivos das transcriptases reversas são compartilhados com todas as transcriptases reversas pertencentes à família de retrotransposons do tipo não-LTR [Eickbush, 1997]. Os números embaixo das linhas indicam os tamanhos das fases de leitura aberta em aminoácidos. O componente TERT de *H. sapiens* (hTERT) representa os vertebrados; *C. parvum* (CpTERT) e *G. lamblia* (GITERT) representam os protozoários Apicomplexa e Diplomonados.

Friedman e Cech [1999] identificaram pelo menos quatro regiões essenciais à atividade da telomerase após análises delecionais na região N-terminal do componente TERT de *S. cerevisiae* (Est2p). Os resultados obtidos sugeriram que a região N-terminal de Est2p faz importantes contatos com o RNA da telomerase e tem um importante papel na interação com outros componentes do complexo da telomerase [Friedman e Cech, 1999]. Resumidamente, os resultados de vários estudos indicam que os motivos QFP, CP e T dos homólogos TERT de *Tetrahymena thermophila*, *S. cerevisiae* e humanos são necessários para a interação do componente protéico com o componente TER de forma específica [Friedman e Cech 1999, Bryan et al. 2000, Armbruster et al. 2001, O'Connor et al. 2005]. Várias funções têm sido propostas para a região conservada do motivo GQ [Xia et al., 2000], incluindo o recrutamento da proteína Est3p, que regula a atividade da telomerase, e a ligação de ácidos nucléicos não-

específicos em leveduras [Xia et al. 2000, Friedman et al., 2003], as interações com o DNA telomérico e o hTR em humanos [Lee et al. 2003; Moriarty et al. 2004] e as interações com o TER de *T. thermophila* [O'Connor et al. 2005]. Já a região do extremo N-terminal da proteína TERT (TEN), apesar de não demonstrar conservação de sequência, mostrou-se importante para a manutenção dos telômeros e a atividade da telomerase quando analisada no complexo RNP nativo [Xia et al., 2000] (Figura 14).

A resolução da estrutura cristalizada da RT do vírus HIV-1 revelou que três motivos são claramente importantes para a sua processividade enzimática: os motivos 1 e 2, que se encontram na região dos dedos e interagem com o nucleotídeo trifosfato que será incorporado, e o motivo E, que se localiza na interface entre os domínios da palma e do polegar e interage com a fita de DNA que será transcrita de forma reversa [Huang et al., 1998]. O motivo C, que apresenta dois resíduos de aspartato invariantes que são essenciais para a ligação a metais e para a química da polimerase, também é importante para a processividade da enzima [Bryan et al., 2000], mas os seus efeitos na processividade são mediados por sua conformação geral e química, e não pelos aminoácidos em si [Peng et al., 2001].

O domínio do extremo N-terminal da proteína TERT (TEN) foi a primeira estrutura obtida em alta-resolução de qualquer porção do componente TERT [Jacobs et al., 2006]. Esta estrutura exhibe na sua superfície resíduos de aminoácidos filogeneticamente conservados, cruciais para a atividade catalítica da telomerase e necessários para a interação sequência-específica do terminal telomérico “3' G-overhang”. Isso demonstra que o domínio TEN interage de forma específica com os substratos de DNA telomérico e também funciona como um domínio de ligação ao RNA independentemente da sequência. A habilidade do domínio TEN de se ligar tanto ao RNA quanto ao DNA telomérico sugere a sua atuação na atividade catalítica da telomerase [Jacobs et al., 2006].

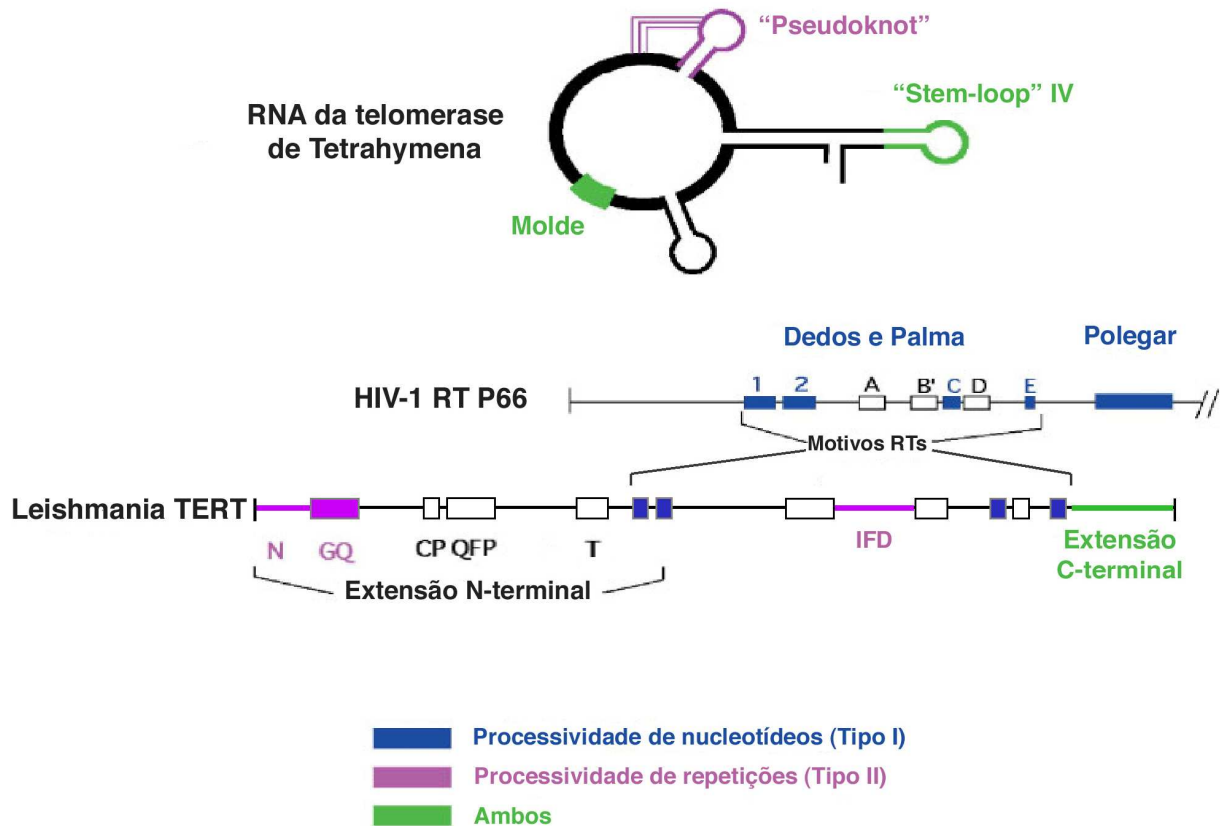


Figura 14 - Determinantes estruturais da processividade da telomerase [adaptado de Lue, 2004]. Estão ilustradas as regiões do RNA da telomerase e do componente protéico TERT que contribuem para a processividade da adição de nucleotídeos ou de repetições. Para fins comparativos, um esquema da transcriptase reversa do HIV-1 também está mostrado. As designações das cores são: azul, estruturas que contribuem para a processividade da adição de nucleotídeos; magenta, estruturas que contribuem para a processividade da adição de repetições; verde, estruturas que contribuem para ambos os tipos de processividade da telomerase. Como ilustrado na figura, todos os componentes protéicos TERT contêm na sua região central sete domínios bem caracterizados das transcriptases reversas (denominados 1, 2, A, B', C, D e E). Além disso, quase todos os componentes TERT possuem na sua região N-terminal um grupo de quatro motivos telomerase-específicos (denominados GQ, CP, QFP e T). A região do extremo N-terminal da proteína (aqui denominada N) não é muito conservada, mas também é funcionalmente importante.

1.5.2.2. O componente RNA da telomerase

Enquanto o componente protéico TERT contém domínios conservados compartilhados por vários organismos filogeneticamente distintos, o componente TER varia bastante em tamanho e sequência primária entre os diferentes organismos (Figura 15) [Chen et al., 2000]. O componente TER fornece a sequência molde para a transcrição reversa, assim como atua na

organização da montagem do complexo ribonucleoprotéico durante o processo de maturação e também na enzima já completamente madura [Zappulla e Cech, 2004, Stone et al., 2007]. Apesar das variações na sequência de nucleotídeos e no tamanho das suas moléculas, alguns elementos das estruturas secundárias do TER parecem compartilhar os mesmos papéis funcionais em ciliados, leveduras e vertebrados, sugerindo que as atividades bioquímicas básicas do RNA da telomerase são bastante conservadas (Figura 15) [Chen et al., 2000, Zappulla et al., 2005]. Sua interação com o componente TERT determina a atividade catalítica, a processividade e a ligação aos telômeros [Hardy et al., 2001, Chen e Greider, 2003, Lai et al., 2003].

As regiões conservadas em vertebrados incluem um domínio do tipo H/ACA na sua extremidade 3', a região do molde, o "pseudoknot" e outros domínios (CR4-5 e CR7, Figura 15) que estão envolvidos na estabilização do RNA, no seu acúmulo, na sua montagem com outros componentes e na sua localização celular [Mitchell et al., 1999a]. Entre os domínios conservados funcionalmente essenciais à telomerase está o "stem-loop" IV (Figura 15), que estimula fortemente a atividade e a processividade da enzima [Chen et al., 2006].

A importância do componente TER para a função da telomerase *in vivo* tem sido bastante estudada em camundongos, nos quais o rompimento genético do TER abole a atividade da telomerase e encurta os telômeros [Blasco et al., 1997], alterando a viabilidade a longo-prazo dos sistemas de renovação dos órgãos [Lee et al., 1998]. Além disso, os telômeros curtos mostraram-se como supressores da progressão tumoral e a oncogênese foi reduzida nas próximas gerações [Greenberg et al., 1999, revisado em Blasco, 2005]. Porém, quando a telomerase foi re-introduzida nesses camundongos, a enzima foi capaz de reconhecer e de estender os telômeros curtos, prevenindo a ocorrência de fusões terminais e o aparecimento de fenótipos de senescência [Hemann et al., 2001, Samper et al., 2001], assim como restaurou o potencial oncogênico [Greenberg et al., 1999]. Estes fatos apontam o uso da telomerase como possível terapia gênica nos casos de doenças humanas que causam o envelhecimento prematuro ou de doenças associadas ao envelhecimento normal, e como possível alvo para o desenvolvimento de drogas capazes de prevenir o crescimento de tumores [Blasco, 2005].

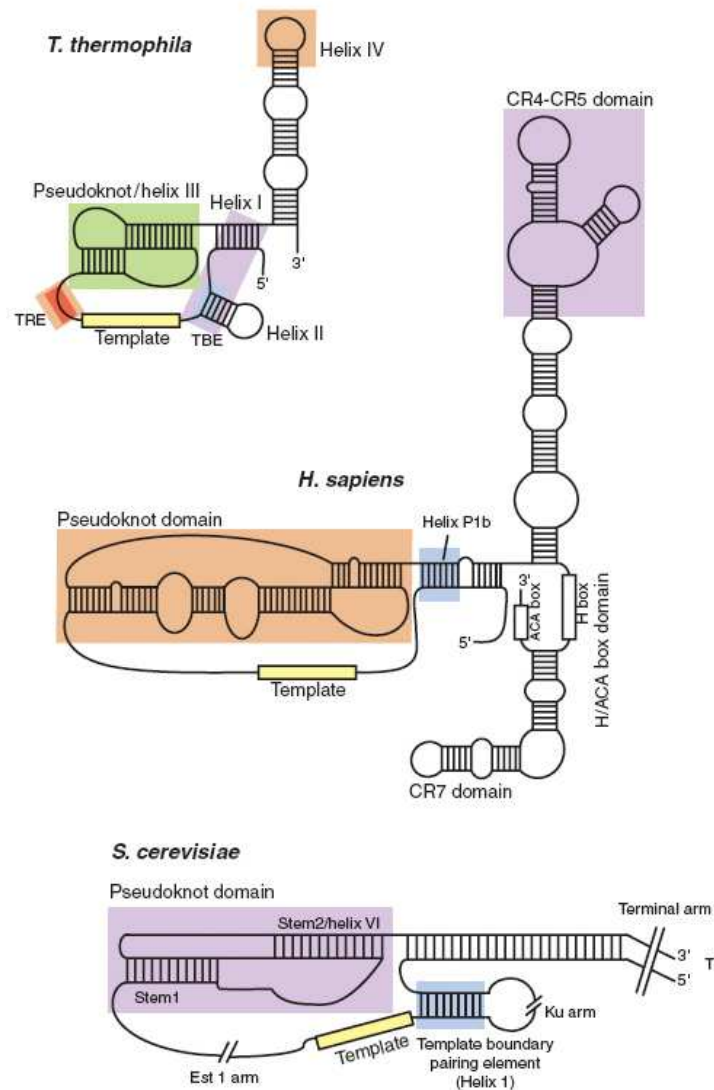


Figura 15 – Estruturas dos RNAs das telomerases [Autexier e Lue, 2006]. Encontram-se ilustradas as estruturas secundárias dos RNAs das telomerases de *T. thermophila*, *H. sapiens* e *S. cerevisiae* [Romero e Blackburn, 1991, Chen et al., 2000, Lin et al., 2004, Zappulla e Cech, 2004, Dandjinou et al., 2004]. Estão indicadas as regiões do molde (em amarelo), as principais regiões de ligação ao componente protéico TERT (caixas em lilás) e elementos de regulação dos limites do molde (caixas em azul). Também estão indicados os sítios de ligação de baixa afinidade ao componente TERT que se localizam na hélice IV e o elemento de reconhece o molde (TRE) em *Tetrahymena*, além do domínio do molde/“pseudoknot” em humanos (em laranja). O componente TER de leveduras é incomumente grande e contém, além do núcleo central apresentado na figura, muitos braços que interagem com diferentes proteínas. Estas partes restantes estão esquematicamente representadas por linhas interrompidas por barras.

1.5.2.3. Outros componentes protéicos do complexo holoenzimático da telomerase

Além dos componentes TERT e TER, o complexo holoenzimático da telomerase necessita da atuação conjunta de proteínas acessórias para ser cataliticamente ativo *in vivo* (Figura 12) [Smogorzewska e de Lange, 2004].

Em *S. cerevisiae*, a telomerase é composta pelos seus componentes usuais TERT (Est2p) e TER (TLC1) e por duas proteínas acessórias: a Est1p e a Est3p [Lendvay et al, 1996, Hughes et al., 2000]. Essas três proteínas atuam em conjunto para recrutar a proteína CDC13, que por sua vez recruta a telomerase para os telômeros. Embora Est1p e Est3p não sejam necessárias para a atividade da telomerase *in vitro* [Lingner et al., 1997b], mutações nos genes que codificam esses componentes levaram ao encurtamento progressivo dos telômeros (fenótipo “*ever shorter telomeres*” ou EST) [Lundblad e Szostak, 1989, Lendvay et al., 1996].

Em humanos, há pelo menos três ortólogos da proteína Est1 de leveduras, dois dos quais (Est1A e B) foram recentemente descobertos como codificadores de proteínas associadas à telomerase, sugerindo um papel conservado para o gene Est1 na regulação das telomerasas [Snow et al., 2003, Reichenbach et al., 2003, revisado em Lundblad, 2003]. Recentemente, Singh e Lue [2003] descreveram a identificação dos ortólogos de Est1-3 em *Candida albicans*.

A disquerina é uma putativa pseudouridina sintase da classe das ribonucleoproteínas portadoras do motivo H/ACA que se liga ao componente RNA da telomerase de humanos [Heiss et al, 1998; Mitchell et al, 1999a]. A disqueratose congênita é uma síndrome humana que apresenta deficiência de telomerase. A forma da doença que é ligada ao cromossomo X é devida a uma mutação na própria disquerina, enquanto a forma autossômica dominante é devida a mutações no gene do componente hTR [Mitchell et al, 1999b]. Pacientes com mutações na disquerina apresentam cinco vezes menos hTR do que as pessoas não afetadas pela doença, implicando esta proteína no processamento ou na estabilidade do RNA da telomerase. Como consequência, estas mutações também resultam em manutenção ineficiente dos telômeros e em baixa atividade da telomerase [Mitchell et al, 1999b].

No protozoário *Tetrahymena*, foram purificadas e caracterizadas as proteínas p65 e p45, que também desempenham papéis essenciais na manutenção dos telômeros atuando como parte do complexo holoenzimático da telomerase desse ciliado e favorecendo a elongação dos telômeros pela telomerase [Witkin e Collins, 2004]. A subunidade protéica p65 contém um motivo La característico de uma família de proteínas ligantes diretas de RNA [revisado em

Wolin e Cedervall, 2002]. Esta proteína está presente no extrato celular associada especificamente com o componente TER e a sua depleção genética reduz o acúmulo do componente TER *in vivo* [Witkin e Collins, 2004]. Mais recentemente, os mesmos pesquisadores caracterizaram os outros dois componentes protéicos do complexo holoenzimático da telomerase de *Tetrahymena* que foram enriquecidos durante a purificação do componente TERT, as subunidades p75 e p20 [Witkin et al., 2007].

1.5.3. Replicação dos telômeros pela telomerase

A telomerase catalisa a síntese *de novo* dos terminais cromossômicos simples-fita da fita rica em G. Como uma RT especializada, ela utiliza uma sequência reversa da repetição telomérica contida no molde do TER para copiar e adicionar novas repetições nos terminais cromossômicos em replicação [Greider e Blackburn, 1989; Shippen-Lentz e Blackburn, 1990].

Durante a replicação do DNA, a telomerase se liga à fita G telomérica, alinhando a extremidade 3' mais distal, ou "3' G-overhang", com o molde do TER e a região 5' dessa extremidade no sítio de ancoragem [Hammond et al., 1997]. A adição de deoxinucleotídeos ao terminal 3'OH ocorre no sítio ativo pela transcrição reversa do molde contido no TER. A interação da telomerase em dois sítios diferentes da fita rica em G permite à extremidade 3' recém-sintetizada se translocar em relação ao TER, ou vice-versa, e dessa forma prosseguir a síntese da repetição subsequente sem que ocorra a completa dissociação dos componentes dessa reação [Greider e Blackburn, 1989] (Figura 16). Este processo, chamado de translocação, envolve a ruptura do pareamento de bases do híbrido DNA-RNA, o reposicionamento do molde de RNA em relação ao sítio ativo da enzima e o reparamento das moléculas de DNA e RNA na região do molde responsável pela interação [Kelleher et al., 2002].

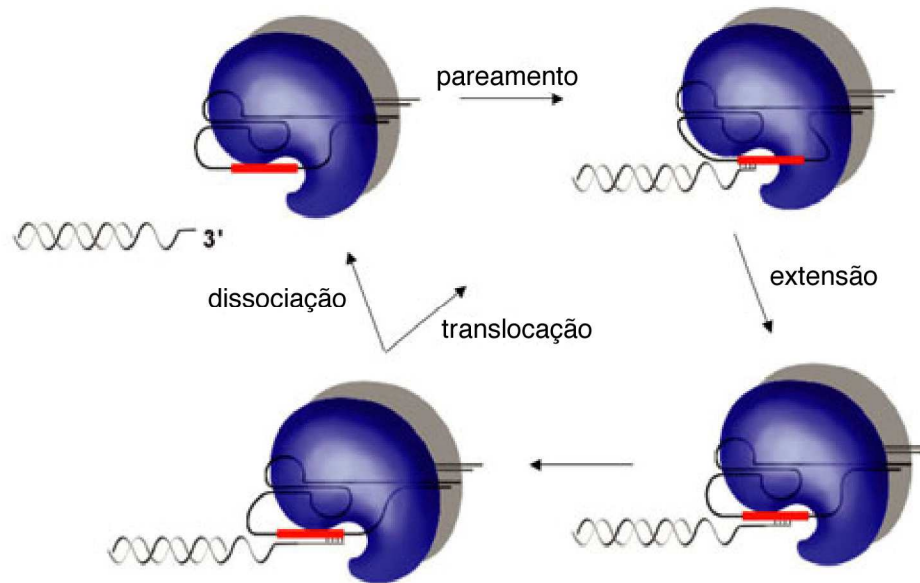


Figura 16 – Ciclo de reação da telomerase [Kelleher et al, 2002]. O componente transcriptase reversa da telomerase (esquemáticamente demonstrado em azul) transcreve de forma reversa o molde do RNA da telomerase (em vermelho) para a síntese das repetições teloméricas. A ligação da telomerase aos telômeros envolve o pareamento de bases com o molde de RNA. Em cada ciclo de transcrição reversa, uma repetição telomérica é adicionada. Após a adição de uma repetição telomérica, a telomerase se dissocia do substrato telomérico ou se transloca para adicionar uma nova repetição.

1.5.4. Regulação da atividade da telomerase por proteínas que atuam nos telômeros

Os telômeros fornecem muitos sítios de ligação para proteínas teloméricas, as quais têm um papel essencial na regulação do comprimento e na proteção dos terminais teloméricos [Mattern et al., 2004]. As proteínas teloméricas são também responsáveis por recrutar a telomerase para os telômeros [Smogorzewska e de Lange, 2004]. Sabe-se que telômeros curtos em humanos e leveduras são substratos preferenciais para a extensão da telomerase, em parte devido à erosão dos sítios de ligação a proteínas que normalmente impedem o acesso da telomerase [Harrington, 2005].

Em mamíferos, existe um complexo multiprotéico denominado shelterina ou telossomo que contém as proteínas TRF1 e TRF2, TIN2, RAP1, POT1 e TPP1 e se liga à região dupla-fita dos telômeros. A shelterina é um complexo dinâmico que atua juntamente com diversas outras proteínas de reparo, alterando a estrutura do DNA telomérico e assim protegendo-o do ataque de nucleases. As proteínas TRF1 e TRF2 ligam-se à região dupla-fita do DNA telomérico e influenciam tanto no comprimento, quanto na proteção dos telômeros [Loayza e de Lange,

2003]. Estas proteínas também tem sido encontradas nos “T-loops” teloméricos [Griffith et al., 1999] e mostraram-se reguladoras negativas da atividade da telomerase, pois favorecem o estado telomérico protegido e inacessível [Smogorzewska et al., 2000]. Por outro lado, a proteína POT1, além de fazer parte do complexo da shelterina, interage com a proteína TPP1, e recruta a telomerase para o terminal telomérico simples-fita, aumentando a processividade enzimática e facilitando a extensão telomérica pela telomerase [Colgin et al., 2003, Xin et al., 2007, Wang et al., 2007]. Esta descoberta sugere uma dupla função para as proteínas POT1: em telômeros longos, elas inibem a atividade da telomerase devido a uma competição pelo substrato de DNA. Quando os telômeros ficam curtos, POT1-TPP1 perdem o seu sítio de ligação ao DNA, se dissociam dos telômeros e passam a agir como fatores de processividade da telomerase. Uma vez restabelecido o tamanho dos telômeros, essas proteínas voltam a se ligar aos telômeros, impedindo o acesso da telomerase [Xin et al., 2007, Wang et al., 2007].

Além das proteínas que fazem parte do complexo da shelterina, outras proteínas também são capazes de atuar na regulação positiva e negativa da atividade da telomerase. A proteína de replicação A (RPA) é uma proteína ligante de DNA simples-fita altamente conservada que também está envolvida no processo de manutenção dos telômeros [Wold, 1997, Smith et al., 2000]. Schramke e colaboradores [2004] descobriram que a RPA ativa a telomerase de leveduras levando a proteína Est1p aos telômeros durante a fase S do ciclo celular. Além disso, a RPA-1 humana, assim como a hPOT1, modula a desestruturação das estruturas denominadas G-quadruplex que são formadas pelo terminal 3' simples-fita rico em G *in vitro*, o que permite o acesso da telomerase aos telômeros [Salas et al, 2006]. Em *Schizosaccharomyces pombe*, a RPA, juntamente com a Taz1, também é requerida para prevenir a rápida perda dos telômeros [Kibe et al, 2007]. Recentemente, foi demonstrado que a RPA-1 está diretamente associada aos telômeros de *Leishmania*, sugerindo uma conservação na ação dessa proteína na manutenção dos telômeros de diferentes organismos [Siqueira-Neto et al., 2007]. A proteína CDC13 desempenha um papel fundamental na regulação positiva da atividade da telomerase de leveduras [Evans e Lundblad, 1999, Bianchi et al., 2004]. Há um modelo de atuação da telomerase *in vivo* que envolve a atuação sinérgica das proteínas RPA-1 e CDC13 nos telômeros de *S. cerevisiae* [Schramke et al., 2004]. A CDC13 parece exercer ainda um outro papel na regulação da atividade da telomerase, coordenando a síntese de ambas as fitas dos telômeros, recrutando primeiro a telomerase e

subseqüentemente limitando a síntese da fita rica em G pela telomerase em resposta à replicação da fita rica em C [Chandra et al., 2001].

Outras proteínas que regulam positivamente a atividade da telomerase são as chaperonas p23 e hsp90 (“heat shock protein 90”). Estas proteínas formam associações estáveis com a telomerase e parecem ser importantes em diversos aspectos do funcionamento da enzima, que vão desde o correto enovelamento do polipeptídeo hTERT nascente e a montagem do complexo hTERT-hTER, até a manutenção de um estado conformacional compatível com a ligação aos telômeros [Forsythe et al, 2001, Keppler et al, 2006].

A proteína nucleolar PinX1 (“Pin2/TRF1-interacting protein”) é conhecida como uma potente inibidora da telomerase em humanos e leveduras [Zhou e Lu, 2001, Guglielmi e Werner, 2002]. Em leveduras, a PinX1 inibe a atividade da telomerase seqüestrando o componente TERT (Est2p) para os nucléolos, impedindo-o de se ligar ao componente TER (TLC1) [Guglielmi e Werner, 2002, Lin e Blackburn, 2004]. Em humanos, a hPinX1 se liga diretamente ao componente hTERT, inibindo a atividade enzimática e agindo como supressora de tumor [Zhou e Lu, 2001]. Um possível homólogo da proteína PinX1 foi clonado recentemente em *L. amazonensis* [capítulo IV desta tese].

No protozoário ciliado *Oxytricha nova*, as proteínas ligantes de DNA simples-fita denominadas subunidades protéicas α e β têm 56 kDa e 41 kDa, respectivamente, e formam entre si um complexo heterodimérico [Froelich-Ammon et al., 1998, Gottschling e Zakian]. Ensaios enzimáticos mostraram que a presença dessas subunidades inibiu a atividade da telomerase, pois elas se ligam ao mesmo substrato de DNA utilizado pela telomerase, ou seja, o DNA telomérico simples-fita rico em G, tornando-o inacessível à replicação [Froelich-Ammon et al., 1998].

1.5.5. A telomerase em protozoários patogênicos

A telomerase tem sido estudada em numerosos organismos, mas muito pouco se conhece sobre as telomerases de protozoários patogênicos.

Os genes que codificam os componentes TERT das telomerases de *T. brucei* e *Leishmania* spp. foram recentemente clonados e caracterizados [Dreesen et al., 2005, Giardini et al., 2006]. Ambos compartilham características canônicas das telomerases, embora as TERTs de diferentes espécies de *Leishmania* apresentem maior homologia entre si do que com as TERTs

de outros tripanossomatídeos e eucariotos [Giardini et al., 2006]. Dreesen e colaboradores [2005] mostraram que a deleção do componente TERT em *T. brucei* gera um progressivo encurtamento dos telômeros, embora isso não pareça ser letal para os parasitas.

Entre os protozoários tripanossomatídeos, a atividade de telomerase foi identificada em extratos semi-purificados de *L. major*, *L. tarentolae*, *T. brucei* [Cano et al., 1999] e *L. amazonensis* [capítulo II desta tese]. Esses estudos mostraram que a atividade *in vitro* da enzima gera produtos de tamanho crescente, com periodicidade equivalente à adição de 6 nt (ou TTAGGG) ao terminal 3' do substrato e que os extratos protéicos desses parasitas são sensíveis ao tratamento com RNase A e à substituição dos nucleotídeos trifosfatos por dideoxinucleotídeos [Cano et al., 1999]. Em *T. cruzi*, a telomerase encontra-se ativa nos diferentes estágios de desenvolvimento do ciclo de vida do parasita [Muñoz e Collins, 2004]. A enzima cataliticamente ativa é um grande complexo ribonucleoprotéico e o molde do RNA da telomerase de *T. cruzi* apresenta uma permutação atípica rica em citosina [Muñoz e Collins, 2004], sendo idêntico ao encontrado no TER de *T. brucei* [Cano et al., 1999].

Nos patógenos *Plasmodium falciparum* e *T. brucei*, a telomerase parece não apenas promover a manutenção dos telômeros, mas também reparar os terminais cromossômicos quebrados [Bottius et al., 1998, Figueiredo e Scherf, 2005, Horn et al., 2000, Dreesen e Cross, 2006]. Em *T. brucei*, quando ocorre quebra de DNA em sítios de expressão transcricionalmente ativos, a telomerase adiciona novas repetições teloméricas para tentar reparar a quebra, evitando rearranjos e fusões cromossômicas. Os novos telômeros formados são estendidos rapidamente no início, mas a taxa de extensão cai conforme os telômeros aumentam de tamanho [Horn et al., 2000, Dreesen e Cross, 2006]. Por outro lado, quando os dois alelos do gene TERT foram rompidos nesses organismos, os telômeros encurtaram gradativamente cerca de 3-6 pb por geração, mas os parasitas não demonstraram nenhuma deficiência no crescimento [Dreesen et al., 2005]. Os telômeros curtos transcricionalmente inativos tendem a se estabilizar com cerca de 41-200 pb utilizando-se de um mecanismo ainda desconhecido capaz de manter a viabilidade dos parasitas mesmo na ausência da telomerase [Dreesen e Cross, 2006, Dreesen et al., 2007].

2. OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivos principais:

- I. A clonagem e o estudo funcional do gene que codifica o componente transcriptase reversa (TERT) da telomerase em *Leishmania* spp.;
- II. A purificação e a caracterização bioquímica da atividade de telomerase de *Leishmania amazonensis*.

3. SOBRE A APRESENTAÇÃO DESTA TESE

Esta tese está apresentada em quatro capítulos:

CAPÍTULO I:

- Clonagem e caracterização do gene que codifica o componente TERT de *Leishmania amazonensis*, cujos resultados estão apresentados na forma de um artigo publicado intitulado: “The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: gene cloning and characterization”. Miriam A. Giardini, Cristina B. B. Lira, Fábio F. Conte, Luciana R. Camillo, Jair L. de Siqueira Neto, Carlos H. I. Ramos, Maria Isabel N. Cano. *Parasitol. Res.* (2006), 98:447-454.
- Resultados complementares:
 - Expressão heteróloga de versões truncadas da proteína LaTERT em sistema bacteriano (*E. coli*);
 - Produção de anticorpos policlonais em coelhos contra as proteínas recombinantes;
 - Teste dos anticorpos por “Western blotting”;
 - Experimentos de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) para verificar a interação da telomerase com o DNA telomérico *in vivo*.

CAPÍTULO II:

- Purificação e caracterização bioquímica da telomerase de *L. amazonensis*, no qual os tópicos de material e métodos, resultados e discussão estão apresentados sob a forma de um manuscrito em preparação.

CAPÍTULO III:

- Geração de ferramentas para a purificação do complexo holoenzimático da telomerase de *T. brucei* utilizando o sistema “PTP-tagging”.
- Tentativa de identificação do componente RNA da telomerase de tripanossomatídeos utilizando ensaios de “primer-extension”.

CAPÍTULO IV:

- Resultados complementares referentes à identificação, amplificação e clonagem de um gene de *L. amazonensis* que apresentou similaridade com a PinX1 de humanos, uma proteína inibidora natural da telomerase.

4. CAPÍTULO I

4.1. CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA O COMPONENTE TRANSCRIPTASE REVERSA DA TELOMERASE DE *Leishmania amazonensis*.

4.1.1. Resumo em português

O gene da telomerase de *Leishmania amazonensis* foi clonado por uma estratégia baseada em PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores desenhados a partir de uma sequência de *Leishmania major* que compartilhava similaridades com os motivos conservados das telomerases. Os genes de outras três espécies foram clonados com propósitos comparativos. O alinhamento múltiplo das sequências através do programa ClustalW demonstrou que as telomerases de *Leishmania* apresentam muito mais homologia entre si do que com as proteínas de outros kinetoplastídeos e eucariotos. Experimentos de caracterização indicaram que o gene predito da telomerase de *Leishmania* encontra-se provavelmente em cópia única e está localizado nos maiores cromossomos. Um único transcrito de mRNA foi encontrado nos promastigotas. Análises filogenéticas sugeriram que a telomerase de *Leishmania* pode representar uma ligação entre os ramos mais antigos e os novos ramos das telomerases.

4.1.2. ARTIGO I: The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: gene cloning and characterization. Miriam A. Giardini, Cristina B. B. Lira, Fábio F. Conte, Luciana R. Camillo, Jair L. de Siqueira Neto, Carlos H. I. Ramos, Maria Isabel N. Cano. *Parasitol. Res.* (2006), 98:447-454.

Miriam A. Giardini · Cristina B. B. Lira ·
Fábio F. Conte · Luciana R. Camillo ·
Jair L. de Siqueira Neto · Carlos H. I. Ramos ·
Maria Isabel N. Cano

The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: gene cloning and characterization

Received: 22 July 2005 / Accepted: 26 September 2005 / Published online: 14 January 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract The *Leishmania amazonensis* telomerase gene was cloned by a polymerase chain reaction-based strategy using primers designed from a *Leishmania major* sequence that shared similarities with conserved telomerase motifs. The genes from three other species were cloned for comparative purposes. A ClustalW multiple-sequence alignment demonstrated that the *Leishmania* telomerases show greater homology with each other than with the proteins of other kinetoplastids and eukaryotes. Characterization experiments indicated that the putative *Leishmania* telomerase gene was probably in single copy and located in the largest chromosomes. A single messenger ribonucleic acid transcript was found in promastigotes. Phylogenetic analysis suggested that *Leishmania* telomerase might represent a liaison between the oldest and the newest branches of telomerases.

Introduction

Telomeres, the physical ends of eukaryotic chromosomes, are specialized nucleoprotein structures responsible for complet-

ing the replication of DNA and for maintaining the integrity and stability of the genome (Blackburn 2005). In most eukaryotes, telomeres are formed by segments of repetitive DNA that associate with proteins. The G-rich strand forms a 3' protrusion that serves as a substrate for telomerase elongation (Greider and Blackburn 1989). In *Leishmania* spp., telomeres consist of conserved TTAGGG repeats, which are maintained by the action of telomerase. A nonconserved telomeric repeat is also found in some *Leishmania braziliensis* chromosomes (Fu and Barker 1998; Cano et al. 1999; Cano 2001). Telomerase is a ribonucleoprotein (RNP) composed of a reverse transcriptase component [telomerase reverse transcriptase (TERT)], an intrinsic RNA component [telomerase RNA (TER)] and several other associated proteins (Bryan and Cech 1999). TERTs show sequence homology with the reverse transcriptase (RT) family of non-LTR retrotransposons and, unlike viral RTs, are associated with TER, which provides the template for the synthesis of telomeric repeats (Malik et al. 2000).

The telomerase RNP was first described in extracts of *Tetrahymena*, but the gene encoding TERT was originally identified in yeast (*Est2*) and then in *Euplotes* extracts using reverse genetics (Lingner et al. 1997). Homologues of the yeast and *Euplotes* TERTs have been identified in *Schizosaccharomyces pombe* and *Candida albicans* (Nakamura et al. 1997), vertebrates (Guo et al. 2001; Kuramoto et al. 2001), plants (Oguchi et al. 1999), ciliates (Lingner et al. 1997; Bryan et al. 1998), and in coccidia and flagellates protozoans (Malik et al. 2000; Figueiredo et al. 2005). The primary structures of all TERTs described so far share features that are hallmarks of telomerases, as well as similarities with other RTs. The conserved N-terminus has at least three motifs (GQ, CP, QFP) that are essential for telomerase activity, RNA binding, and multimerization (Xia et al. 2000; Armbruster et al. 2001; Lai et al. 2001), in addition to the dissociates activities of telomerase domain that is essential for telomere elongation (Armbruster et al. 2001).

The TERT central domain contains the T (telomerase-specific) and the reverse transcriptase (1, 2 and A-E) motifs that are essential for enzyme activity (Lingner et al. 1997; Nakamura et al. 1997; Weinrich et al. 1997; Counter et

M. A. Giardini · C. B. B. Lira · F. F. Conte ·
J. L. de Siqueira Neto · M. I. N. Cano (✉)
Departamento de Patologia Clínica,
Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental,
Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
CP 6109, Campinas, SP,
CEP 13083-970, Brazil
e-mail: micano@unicamp.br
Tel.: +55-19-37887390
Fax: +55-19-37887414

L. R. Camillo · C. H. I. Ramos
Centro de Biologia Molecular Estrutural,
Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS),
Campinas, SP, Brazil

Present address:

M. I. N. Cano
Departamento Genética, IBB, UNESP-Botucatu,
Distrito de Rubião Júnior s/n, Rubião Júnior,
CEP 18618-000 Botucatu, SP, Brazil

al. 1997). Within this catalytic core domain, there are features shared with all TERTs, such as: (i) the distance between motifs A and B', which is longer in TERTs than in other RTs, and (ii) the sequence consensus of motifs C (hxDD(F/Y)) and E (WxGxSx), which in other RTs are (F/Y)xDDh (motif C) and hLGxxh (motif E). The mutation of conserved residues in the RT motifs of TERT resulted in abrogation of telomerase activity in yeast and human cells (Lingner et al. 1997; Weinrich et al. 1997; Counter et al. 1997). In contrast, the C-terminal region of TERTs from distant organisms shows only weak or no obvious sequence conservation (Malik et al. 2000; Nakamura et al. 1997).

Many studies have implicated TERT in cellular aging, immortalization, and transformation. Interestingly, expression of the human gene (hTERT) restores telomerase activity in telomerase-negative human cells (Weinrich et al. 1997; Counter et al. 1997). The ectopic expression of hTERT in normal human diploid fibroblasts is sufficient to extend their lifespan in culture, in agreement with a central role for this protein in regulating telomere length and lifespan in human cells (Bodnar et al. 1998).

To extend our knowledge of telomere components and replication, we investigated the human pathogen *Leishmania* spp., a kinetoplastid protozoan from which the genome has already been sequenced (Ivens et al. 2005). Different species of *Leishmania* are the causative agents of leishmaniasis, an infectious disease that threatens millions of people around the world and is commonly found in coinfection with HIV (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/>). As an initial step toward understanding the telomerase of *Leishmania* at a molecular level, we report here the molecular cloning and characterization of the gene for the putative *Leishmania amazonensis* telomerase catalytic subunit [*L. amazonensis* TERT (LaTERT)]. For comparative purposes, the same gene was cloned from other parasite species (*Leishmania major*, *Leishmania donovani*, and *L. braziliensis*), the causative agents of tegumentar and visceral leishmaniasis. The results presented here support the conclusion that the TERT catalytic subunit is a universally conserved feature of telomerases.

Materials and methods

Growth of *Leishmania* spp. promastigotes

Promastigotes of *L. amazonensis* strain MHOM/BR/73/M2269, *L. major* strain MHOM/IL/81/Friedlin, *L. braziliensis* strain MHOM/BR/2903, and *L. donovani* strain MHOM/SD/00/Khartoum were cultivated in exponential growth in Schneider's (Sigma) or M199 (Cultilab) medium, supplemented with 5–20% heat inactivated fetal bovine serum and 1× antibiotic/antimycotic solution (Invitrogen) at 28°C.

RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was extracted from approximately 1×10^9 log phase promastigotes using Trizol reagent (Invitrogen). Poly

A+ messenger ribonucleic acid (mRNA) was extracted from ~0.95 mg of total RNA using a Message Maker reagent assembly (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was done using the telomerase primer set p2F and p7R (Table 1) and the cMaster RT plus PCR system (Eppendorf). Approximately 400 ng of mRNA was reverse transcribed into complementary DNA (cDNA). The *L. amazonensis* silent information regulator (SIR2) gene (accession number AF534109) was amplified as a control for the amount of mRNA used in the reactions.

Isolation of *Leishmania* spp. genomic DNA and cloning of *Leishmania* spp. TERTs

Genomic DNA was extracted using TELT buffer [10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) pH 8.0, 100 mM lithium chloride and 0.1% Triton X-100] according to Cotrim et al. (1990).

PCR products spanning the entire *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. major*, and *L. donovani* open reading frames (ORFs) (4,350 bp) were obtained using primer set p1F and p10R and 1 U of Platinum Taq (Invitrogen), followed by cloning in the pCR 2.1 cloning vector (Invitrogen). The PCR products were sequenced automatically using specific primers and primers from the vector (Table 1).

Table 1 Primer sets used for PCR amplification and sequencing of the putative *Leishmania* TERT genes

Primers	Sequences
p1F ^a	5'-ATGTCGCGCTCGTTTCCA-3'
p2F ^a	5'-CTTCTCTACCAACACTTCT-3'
p3F ^b	5'-AGCAAAGGCGTGTGGAGGCGG-3'
p3R ^b	5'-CCGCCTCCACACGCCCTTGTCT-3'
p4F ^b	5'-GACTTGCCATCTACCTG-3'
p5F ^b	5'-GCGCTACCCTTGCCACAC-3'
p5R ^b	5'-GTGTGGCAAGGGTAGCGC-3'
p6R ^b	5'-AGCGGGTGAGCAGAGCGATGG-3'
p7F ^a	5'-CGTTGCTATGATAACTTACCAC-3'
p7R ^a	5'-GTGGTAAGTTATCATAGCAACG-3'
p8F ^a	5'-TGTGCGGCCGTATGAATC-3'
p8R ^a	5'-GAGTTCATACGCGCCGACA-3'
p9R ^a	5'-CATAACAGACCAACCTCGTAG-3'
p10R ^a	5'-TCAAGTCTGCGAGAGTCG-3'
M13F ^c	5'-GTAAACGACGGCCAGT-3'
M13R ^c	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

F forward, R reverse

^aOligonucleotides designed based on the *L. major* sequence found in the database

^bOligonucleotides designed from internal fragments obtained from the *L. amazonensis* TERT sequence

^cOligonucleotides from pCR 2.1 cloning vector (Invitrogen)

Southern blotting and chromosomal mapping

Aliquots of 10 µg of genomic DNA were digested with 10 U of different restriction enzymes. For Southern blotting, DNAs were then fractionated in 0.8% agarose gels in 0.5× Tris-acetate-EDTA (20 mM Tris-acetate, 0.5 mM EDTA pH 8.0) and transferred to Hybond-N+ membranes (Amersham Biosciences) according to Sambrook and Russell (2001). The membranes were hybridized with two different [α - 32 P]2'-deoxyguanosine 5' triphosphate (dGTP)-labeled internal LaTERT fragments (Megaprime DNA Labeling System, Amersham Biosciences) in hybridization buffer (40 mM phosphate buffer, pH 7.2, 1 mM EDTA pH 8.0, 1% SDS) at 65°C. After hybridization, the membranes were washed at high stringency and exposed to X-ray film at -80°C (X-Omat, Kodak).

Intact chromosomes from *Leishmania* spp. were prepared using 1×10^5 promastigotes (Wincker et al. 1996). The chromosomes were separated by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) in 1.1% agarose gels (Amersham Biosciences) in 0.5× Tris-borate-EDTA (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA pH 8.0) in a "Gene Navigator" apparatus (Amersham Biosciences). The running conditions were optimized so as to separate most of the *Leishmania* chromosomes in a single gel (Conte and Cano 2005). After electrophoresis, the gels were stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml), photographed, and alkaline transferred to Hybond-N+ membranes (Sambrook and Russell 2001). The membranes were hybridized as described above. *Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula wiggaei* chromosomes (Bio-Rad) were used as molecular weight markers.

Phylogenetic analyses and sequence alignments

Sequence alignments were done with protein-protein basic local alignment search tool (BLASTp) and BLAST 2 sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) using default parameters and with ClustalW using a gap open penalty of ten and an ID matrix. All of the other parameters were default. One possible phylogenetic tree

was constructed by aligning the amino acid sequences of the specific motif T and motifs 1, 2, and A through E using the neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987). The analyses were done using MEGA version 3.0 (<http://www.megasoftware.net>) (Kumar et al. 2004).

Results and discussion

Structural characterization of the putative *Leishmania* TERT gene

Leishmania sequences deposited in the recently finished *L. major* genome database (<http://www.ebi.ac.uk/parasites/leish.html>, Ivens et al. 2005) and in the whole genome shotgun reads of *L. braziliensis* and *Leishmania infantum* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/L_braziliensis/ and http://www.sanger.ac.uk/Projects/L_infantum/) were searched via the OmniBLAST server for putative TERTs using the most conserved part of yeast [*S. cerevisiae* (Sc_Est2p), accession number NP_013422], ciliate [*Tetrahymena thermophila* (Tt_TERT), accession number O77448], and vertebrate [human (hTERT), accession number O14746; hamster (hamTERT), accession number AAF17334; *Xenopus laevis* (xTERT), accession number AAG43537] telomerase protein sequences consisting of motifs T, 1, 2, and A through E. Returned *L. major* (accession number LmjF36.3930) sequence and *L. braziliensis* and *L. infantum* shotgun reads were translated and examined for the presence of TERT motifs. The deduced polypeptide sequences of 1,452 amino acid residues contained ORFs with sequence similarity to conserved motifs of known telomerases and were confirmed by BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) and ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) sequence alignments (Table 2 and data not shown).

Overlapping PCR products were obtained from the amplification of *L. amazonensis* genomic DNA (Cotrim et al. 1990) and cDNA by using different primer sets (Table 1), some designed from the returned *L. major* sequence and others from the LaTERT sequence. Sequence alignments by BLAST 2 and ClustalW indicated that the putative LaTERT (accession number AY232307), *L. major*

Table 2 Amino acid and nucleotide sequence alignments of the putative trypanosomatid TERT genes using BLAST 2 sequences

	LaTERT		LbTERT		LdTERT		LmTERT	
	Nucleotides (%)	Amino acids (%)	Nucleotides (%)	Amino acids (%)	Nucleotides (%)	Amino acids (%)	Nucleotides (%)	Amino acids (%)
LmTERT	97	95 (95)	98	93 (94)	90	85 (87)	—	—
LdTERT	90	84 (86)	90	82 (84)	—	—	—	—
LbTERT	98	93 (93)	—	—	—	—	—	—
LaTERT	—	—	—	—	—	—	—	—
TcTERT	No significant similarity	31 (42)	No significant similarity	32 (43)	No significant similarity	33 (45)	No significant similarity	32 (43)
TbTERT	No significant similarity	32 (44)	No significant similarity	30 (41)	No significant similarity	29 (39)	No significant similarity	31 (43)

The values indicate the percentage of identity (% similarity in brackets) of the sequences aligned by BLAST

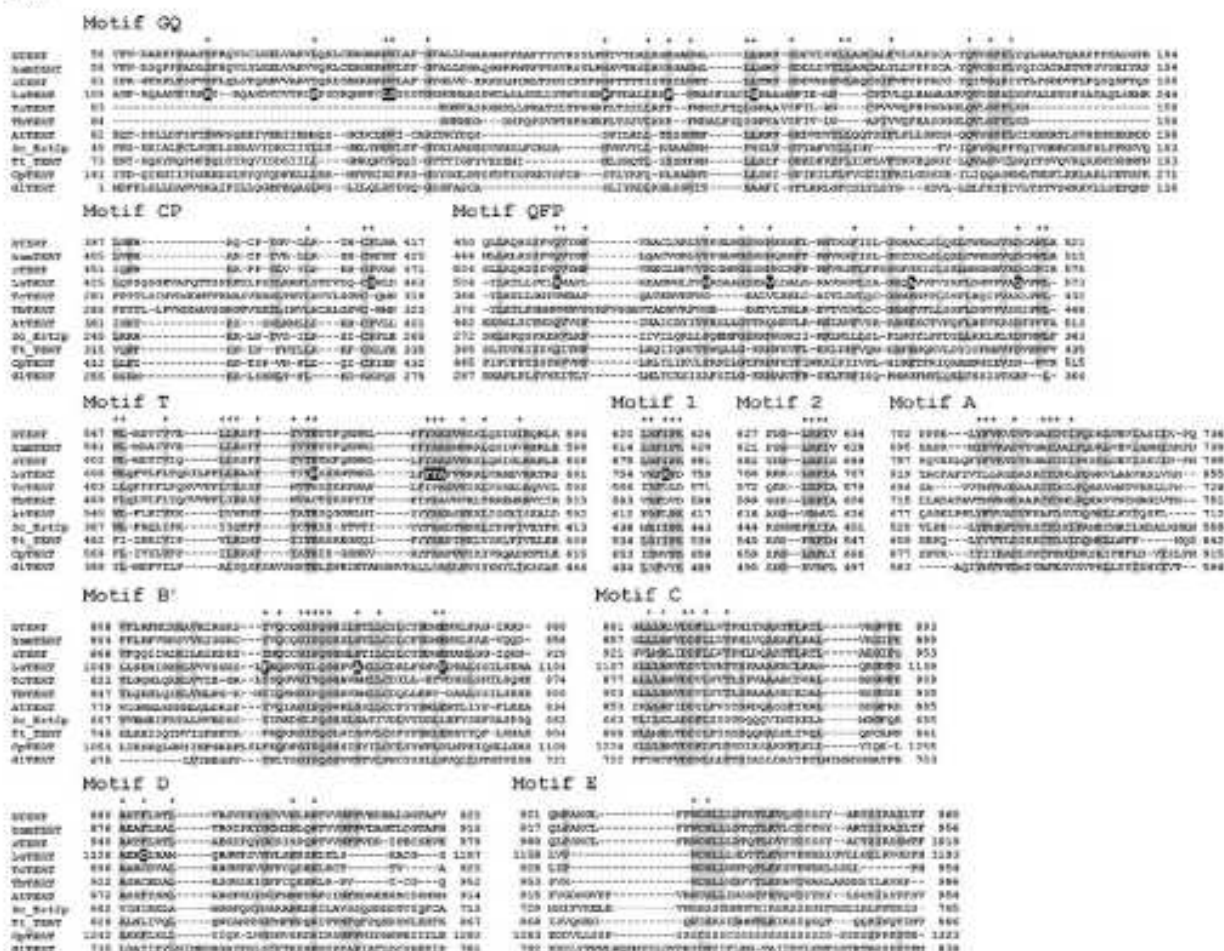
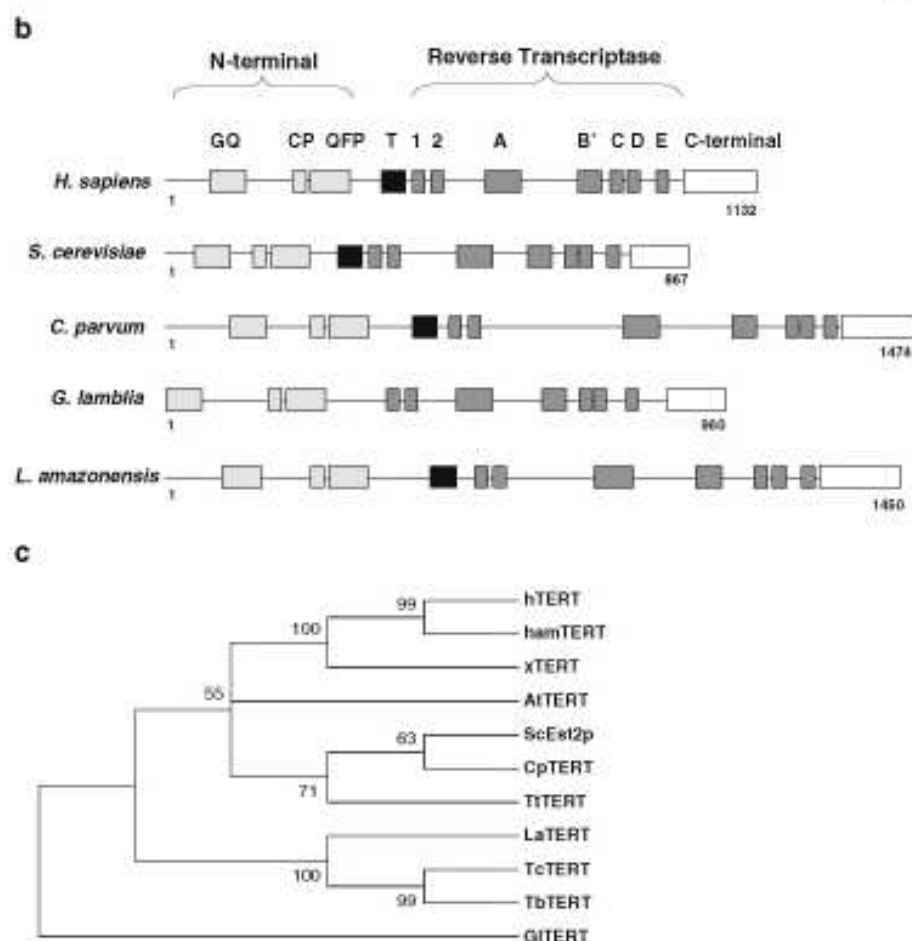


Fig. 1 Phylogenetic analysis of the *L. amazonensis* TERT. **a** Multiple alignment of the amino acid sequences of the TERT motifs. The amino acid sequences of the *Homo sapiens* (hTERT, accession number O14746), *Mesocricetus auratus* (hamTERT, accession number AAF17334), *X. laevis* (xTERT, accession number AAG43537), *L. amazonensis* (LaTERT, accession number AY232307), *T. cruzi* (TcTERT, TIGR DB accession number Tc00.1047053510719.200), *T. brucei* (TbTERT, TIGR DB accession number Tb11.01.1950), *Arabidopsis thaliana* (AtTERT, accession number CAC01849), *S. cerevisiae* (Sc Est2p, accession number NP_013422), *T. thermophila* (Tt TERT, accession number O77448), *C. parvum* (CpTERT accession number EAK88680), and *G. lamblia* (GtTERT, accession number AF195121) telomerase genes were aligned with ClustalW using a gap open of ten and an ID matrix. When necessary, few manual adjustments were also made. The motifs appear in sequential order, from the N to the C terminus. The N-terminal motifs GQ, CP, and QFP were determined according to Xia et al. (2000); motif T and the reverse transcriptase motifs 1, 2, and A through E were determined as described in Bryan et al. (1998). Amino acid residues that appear in at least five of the TERT sequences are highlighted in gray. The asterisks indicate the positions of highly conserved amino acid residues within the TERT motifs according to Xia et al. (2000) and Bryan et al. (1998). Among these conserved residues, there are some amino acid substitutions in LaTERT (highlighted in black). Abbreviations for the amino acids are

as follows: A Ala, C Cys, D aspartate (Asp), E Glu, F phenylalanine (Phe), G glycine (Gly), H His, I Ile, K Lys, L leucine (Leu), M methionine (Met), N asparagine (Asn), P Pro, Q Gln, R Arg, S serine (Ser), T Thr, V valine (Val), W tryptophan (Trp), Y Tyr. **b** The *L. amazonensis* TERT contains the conserved internal TERT motifs found in phylogenetically distant organisms. TERT conserved motifs: N-terminal, T, and the reverse transcriptase motifs 1, 2, and A through E. The N-terminal and T motifs are telomerase-specific, whereas the reverse transcriptase motifs are shared with all reverse transcriptases belonging to the non-LTR family. The numbers under the lines indicate the sizes of the ORFs in amino acids. The region between motifs N-terminal and T (linkers) are species-specific. The great distance between motifs A and B' is characteristic of TERTs and differentiates them from other RTs. *H. sapiens* (hTERT) represents vertebrate TERTs, *S. cerevisiae* (Sc Est2p) represents yeast TERTs, *C. parvum* (CpTERT) and *G. lamblia* (GtTERT) represent apicomplexa and diplomonad protozoans, respectively. **c** A possible phylogenetic tree of some telomerase reverse transcriptases identified to date. The neighbor-joining distance unrooted tree was constructed by alignment of motif T plus RT motifs 1, 2, and A through E. The alignment was done as in **a**. The analyses were done using the MEGA version 3.0 program. The statistical support for each node is indicated as the percentage of 1,000 bootstraps and branches were collapsed if bootstrap support was less than 50%.

Fig. 1 (continued)



TERT (LmTERT) (accession number AY232305), *L. braziliensis* TERT (LbTERT) (accession number AY268078) and *L. donovani* TERT (LdTERT) (accession number AY780672) genes were very similar (~85%) to the LmjF36.3930 sequence with a high degree of conservation among them (Table 2 and data not shown). They were also aligned by BLAST 2 with the putative *Trypanosoma brucei* (accession number Tb11.01.1950) and *Trypanosoma cruzi* (accession number Tc00.1047053510719.200) TERTs, showing significant similarities (42–44%) only among amino acid sequences (Table 2).

All four *Leishmania* TERTs studied had a motif T that was characteristic of all *Leishmania* TERTs, in addition to the reverse transcriptase motifs 1, 2, and A through E, and the less conserved N-terminal and C-terminal domains. ClustalW multiple-sequence alignment was used to compare the putative amino acid sequence of LaTERT with ten other phylogenetically divergent TERT protein sequences (Fig. 1a). As in other TERTs, *Leishmania* TERTs contained the large segment between motifs A and B' and most of the indispensable amino acids important for telomerase activity and cell viability, such as arginine 755 (Arg755) in motif 1, Arg764 in motif 2, aspartate 932

(Asp932) in motif A, glutamine 1075 (Gln1075)–glycine 1076 (Gly1076) in motif B' and Asp1114–Asp1115 in motif C (Fig. 1a,b, and data not shown). However, the *Leishmania* TERTs also contained some important amino acid substitutions within the conserved TERT motifs. Some of these substitutions occurred in part in the telomerase-specific motif T (FI/YxTE) found in all TERTs, except those of *Giardia* (accession number AF195121) and *Caenorhabditis elegans* (accession number Z96047) (Malik et al. 2000). In the *Leishmania* TERTs, two hydrophobic residues, tryptophan 632 (Trp632) and proline 644 (Pro644), substituted the charged residues glutamate (Glu) and arginine (Arg), respectively. In addition, a conservative substitution occurred at position 629 where a threonine (Thr) appeared in the place of isoleucine (Ile)/tyrosine (Tyr), the latter being conserved in all other TERTs. Interestingly, *T. brucei* and *T. cruzi* TERTs (TbTERT and TcTERT, respectively) also presented amino acid substitutions within motif T. For example, they both showed a charged histidine (His) residue in the place of the conserved Ile/Tyr (Thr629 in LaTERT). Moreover, in TbTERT, the conserved Thr (Thr631 in LaTERT) was substituted by a hydrophobic alanine (Ala)

(Fig. 1a) and a polar cysteine (Cys) appears in the place of the conserved Glu (Trp632 in LaTERT). The motif QFP at the N-terminus and the C-terminal domain were the least conserved motifs in *Leishmania* and trypanosomes, as in other TERTs (Fig. 1 and data not shown). In *S. cerevisiae*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, and *Leishmania* TERTs, a polar residue (Gln) was replaced by a charged residue (Arg or lysine (Lys); Arg513 in *Leishmania* TERT). In addition, in *Leishmania* TERTs, the hydrophobic residue proline (Pro) was replaced by the polar residue Gly527 (Fig. 1a). The importance of these amino acid substitutions for TERT function at parasite telomeres will probably be revealed by the expression of mutated and truncated telomerase genes in *Leishmania*. In Fig. 1b, a diagram shows the position of the TERT domains within distant phylogenetic TERTs, and demonstrates that together with *C. parvum* (accession number EAK88680) and *Plasmodium* spp. (Figueiredo et al. 2005) TERTs, *Leishmania* TERT is one of the biggest telomerases described so far.

Telomerase is predicted to correlate with or predate the origin of eukaryotes because linear chromosomes with telomeric repeats have been found in the oldest known eukaryotes (Malik et al. 2000). The extent of homology between the motifs of known TERT proteins (Fig. 1a) and a possible phylogenetic tree based on these analyses (Fig. 1c)

are shown. The neighbor-joining phylogenetic tree shown in Fig. 1c was obtained by aligning the amino acid sequences of the specific motif T and motifs 1, 2, and A through E using *MEGA* version 3.0 (Kumar et al. 2004). The inclusion of TERT sequences from other kinetoplastids helped us to establish a more accurate relationship among these proteins. This tree clustered the *Leishmania* and trypanosome TERTs with the diplomonads (*G. lamblia*) at a basal position, and all of the other clustering patterns

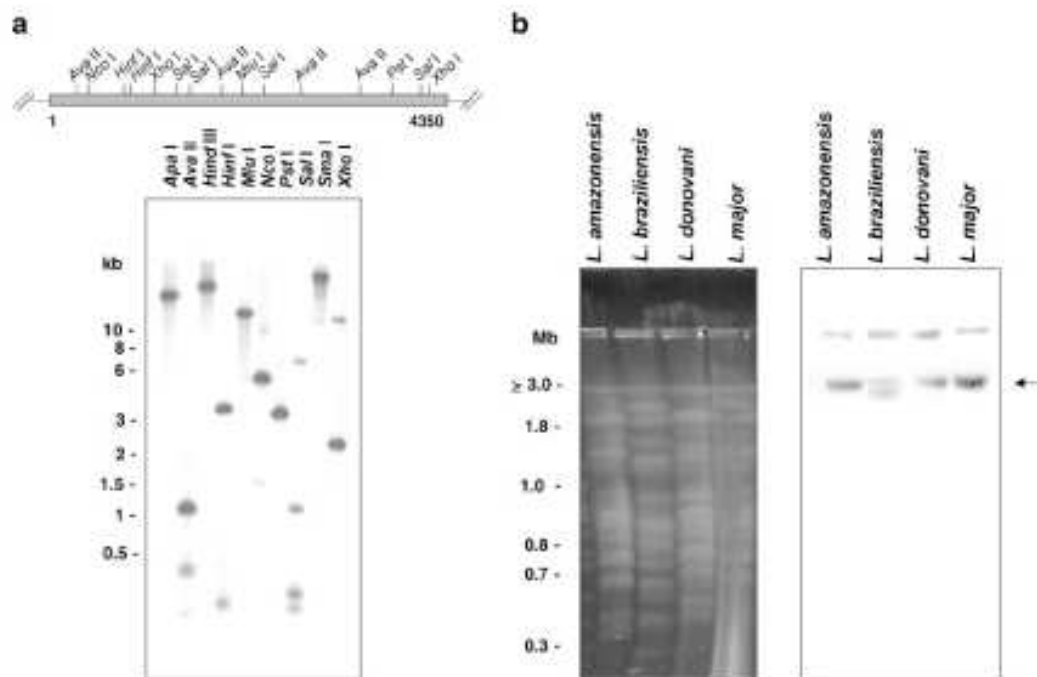
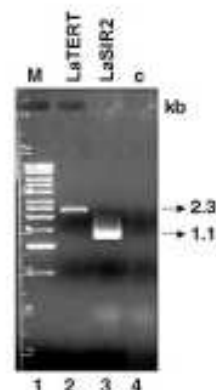


Fig. 2 Genomic organization of *L. amazonensis* TERT and chromosomal mapping of *Leishmania* spp. TERTs. **a** A restriction map of the LaTERT locus obtained by GeneRunner analysis of the cleavage sites (top) was confirmed by a Southern blotting of *L. amazonensis* genomic DNA digested with *Apa*I (lane 1), *Ava*II (lane 2), *Hind*III (lane 3), *Hinf*I (lane 4), *Mlu*I (lane 5), *Nco*I (lane 6), *Pst*I (lane 7), *Sal*I (lane 8), *Sma*I (lane 9), and *Xho*I (lane 10) and hybridized with an [α - 32 P]dGTP-labeled 2.3 kb fragment containing the partial sequence of the putative LaTERT gene under high

stringency conditions (bottom). **b** Chromosomal-sized DNA bands separated by PFGE were hybridized with the same probe and under the same conditions as in **a**. On the left, ethidium bromide-stained chromosomes from *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani*, and *L. major*. The numbers on the left of the figure refer to standard molecular weight markers (BioRad). On the right, an arrow points the location of the *Leishmania* TERT genes in the largest chromosomal bands of all parasite species.

were similar to those previously described (Malik et al. 2000; Nakamura et al. 1997; Bryan et al. 1998). The tree was consistent with the known evolutionary relationships of these organisms and probably reflected the presence of a less conserved motif T in the putative trypanosomatid TERTs. In addition, it suggested that trypanosomatid TERTs might represent a liaison between the oldest branches and the newest branches of telomerase reverse transcriptase.

Genomic organization and chromosomal mapping of *Leishmania* TERT

The LmTERT gene sequence annotated in the public database (accession number LmjF36.3930) is single copy and has a truncate/pseudogene homolog on chromosome 28 (accession number LM28_BIN_Contig1729), which lacks the N-terminal domain and motifs T-A. In agreement, analysis of the genomic organization and chromosomal mapping of other *Leishmania* spp. TERT genes revealed that they occurred in a low copy number in the parasite genome (Fig. 2a and data not shown).

In the Southern experiments done with genomic DNA extracted from promastigotes (Cotrim et al. 1990), La TERT, LmTERT, and LbTERT had a highly conserved organization compared to the less conserved LdTERT (data not shown). A partial restriction map of the LaTERT gene was then constructed (Fig. 2a, top) based on the analysis of cutting sites using GeneRunner (<http://www.generunner.com>) and Southern blotting (Fig. 2a, bottom). The results showed that *Apal*, *HindIII*, *MluI*, and *SmaI* do not cut the gene, whereas *AvaI*, *HinfI*, *NcoI*, *PstI*, *Sall* and *XhoI* cut LaTERT at more than one site (Fig. 2a bottom, lanes 2, 4, 6, 7, 8 and 10). The hybridization profile was compatible with the presence of a low copy number gene confirming the initial findings at the *L. major* genome database and at the *L. braziliensis* and *L. infantum* whole genome shotguns. The chromosomal map location of the TERT gene in the different *Leishmania* species, shown in Fig. 2b, was done using intact chromosomes from *Leishmania* spp. promastigotes (Conte and Cano 2005). The results demonstrated that TERT was located in a chromosomal band of approximately 3.0 Mb, which corresponds to the largest chromosome in most *Leishmania* species according to Wincker et al. (1996) and Conte and Cano (2005). In *L. braziliensis*, TERT hybridized with the largest chromosomal bands that probably correspond to chromosome 36 and to the fused version of chromosomes 20 and 34 (Britto et al. 1998).

Together, the results obtained from the genome database and from the Southern blotting analyses suggested that the sequences encoding the putative TERT genes in *Leishmania* spp. are highly conserved and probably present in single copy.

Expression of *Leishmania* TERT mRNA

The analysis of *Leishmania* TERT expression was done by RT-PCR using poly A+ mRNA obtained from log phase

promastigotes that was reverse transcribed into cDNA (Fig. 3, lane 2). The *L. amazonensis* SIR2 gene (accession number AF534109) was amplified as a control for the amount of mRNA used in the reactions (Fig. 3, lane 3). The results indicated that telomerase is expressed in promastigotes, corroborating our earlier findings about the presence of enzyme activity in extracts of *Leishmania* promastigotes (Cano et al. 1999 and data not shown), and the recent identification of the gene encoding the protein component in the *T. cruzi*, *T. brucei*, and *L. major* genomes (El-Sayed et al. 2005).

The above results about the identification of a putative LaTERT gene support the idea that telomerase is, indeed, involved in maintaining parasite telomeres. *Leishmania* proteins showed much greater homology with each other than with other protozoan proteins, including TbTERT and TcTERT. These differences between *Leishmania* and other protozoan TERTs may provide insights into the structure and function of these proteins and should contribute to our understanding of the evolution of these genes.

Acknowledgements The authors thank colleagues in Dr. M.L.N. Cano's laboratory for helpful discussions during the experiments described here, J. Borecký (Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP) for the assistance during the construction of the phylogenetic tree and S. Hyslop (Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP) for reviewing the English of the manuscript. This investigation received support from the UNDP/World Bank/World Health Organization Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR, ID A00753) and from FAPESP (grant 00/01138-6). M.A. Giardini was supported by a doctoral fellowship from FAPESP (grant 03/01783-7). All the experiments described comply with the current laws of Brazil where the experiments were performed.

References

- Armbruster B, Banik SR, Guo CH, Smith AC, Counter CM (2001) N-terminal domains of the human telomerase catalytic subunit required for enzyme activity in vivo. *Mol Cell Biol* 21:7775-7786
- Blackburn EH (2005) Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett* 579:859-862
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Hurley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349-352
- Britto C, Ravel C, Bastien P, Blaineau C, Pagès M, Dedet JP, Wincker P (1998) Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene* 222:107-117
- Bryan TM, Cech TR (1999) Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol* 11:318-324
- Bryan TM, Spenger JM, Chapman KB, Cech TR (1998) Telomerase reverse transcriptase genes identified in *Tetrahymena thermophila* and *Oxytricha trifallax*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8479-8484
- Cano MIN (2001) Telomere biology of trypanosomatids: more questions than answers. *Trends Parasitol* 17:425-429
- Cano MIN, Dungan J, Agabian N, Blackburn EH (1999) Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3616-3621
- Conte FF, Cano MIN (2005) Genomic organization of telomeric and subtelomeric sequences of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *Int J Parasitol* 35:1435-1443

- Cotrim PC, Paranhos GS, Mortara RA, Wanderley W, Rassi A, Camargo ME, Franco da Silveira J (1990) Expression in *Escherichia coli* of a dominant immunogen of *Trypanosoma cruzi* recognized by human chagasic sera. *J Clin Microbiol* 28:519–524
- Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Weinberg RA (1997) The catalytic subunit of yeast telomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9202–9207
- El-Sayed NM, Myler P, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran A-N, Ghedin E, Worthey EA, Delcher A, Blandin G, Westenberger SJ, Caceres E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Amer E, Aslund L, Attipoe A, Bontempi E, Brinkhaus B, Burton P, Cadag E, Campbell DA et al (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309:409–415
- Figueiredo LM, Rocha EPC, Mancio-Silva LM, Prevost C, Hernandez-Verdun D, Scherf A (2005) The unusually large *Plasmodium* telomerase reverse-transcriptase localizes in a discrete compartment associated with the nucleolus. *Nucleic Acids Res* 33:1111–1122
- Fu G, Barker D (1998) Characterisation of *Leishmania* telomeres reveals unusual telomeric repeats and conserved telomere-associated sequence. *Nucleic Acids Res* 26:2161–2167
- Greider CW, Blackburn EH (1989) A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337:331–337
- Guo W, Okamoto M, Lee YM, Baluda MA, Park NH (2001) Enhanced activity of cloned hamster TERT gene promoter in transformed cells. *Biochim Biophys Acta* 1517:398–409
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream M-A, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM et al (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 319:436–442
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5:150–163
- Kuramoto M, Ohsumi K, Kishimoto T, Ishikawa F (2001) Identification and analyses of the *Xenopus* TERT gene that encodes the catalytic subunit of telomerase. *Gene* 277:101–110
- Lai CK, Mitchell JR, Collins KD (2001) RNA binding domain of telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell Biol* 21:990–1000
- Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR (1997) Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276:561–567
- Malik HS, Burke WD, Eickbush TH (2000) Putative telomerase catalytic subunits from *Giardia lamblia* and *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 251:101–108
- Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR (1997) Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277:955–959
- 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
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE, Bodnar AG, Lichtsteiner S, Kim NW, Trager JB, Taylor RD, Carlos R, Andrews WH, Wright WE, Shay JW, Harley CB, Morin GB (1997) Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet* 17:498–502
- Wincker P, Ravel C, Blainey C, Pages M, Jauffret Y, Dedet JP, Bastien P (1996) The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res* 24:1688–1694
- Xia J, Peng Y, Mian IS, Lue NF (2000) Identification of functionally important domains in the N-terminal region of telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell Biol* 20:5196–5207

4.2. RESULTADOS COMPLEMENTARES:

4.2.1. Considerações iniciais

Após a identificação e a caracterização do gene TERT de *L. amazonensis* (LaTERT), tornou-se imprescindível o estudo funcional da proteína codificada por esse gene. Para possibilitar e dar início a esses experimentos, foi necessária a obtenção de anticorpos específicos contra a proteína LaTERT inteira ou contra seus fragmentos internos. Para isso, dois fragmentos internos do gene LaTERT foram amplificados por PCR e clonados em sistema de expressão bacteriana. As proteínas recombinantes truncadas foram expressas e inoculadas em coelhos para que houvesse a produção de anticorpos policlonais específicos. Os anticorpos obtidos foram analisados por experimentos de “Western blotting” e imunoprecipitação de cromatina (ChIP).

4.2.2. Material e Métodos

4.2.2.1. Cultura de bactérias

As bactérias *Escherichia coli* foram cultivadas em meio LB [Sambrook e Russell, 2001] constituído de 1% triptona, 0,5% extrato de levedura e 1% NaCl. As bactérias da cepa DH5 α foram utilizadas para a multiplicação e a manutenção dos vetores de clonagem pCR[®] 2.1 (Invitrogen) e foram selecionadas em meio LB contendo 50 μ g/ml de ampicilina. As bactérias da cepa BL21(DE3)RP códon plus foram utilizadas para a expressão das construções gênicas com o vetor pET-28a(+) (Novagen) e foram selecionadas em meio LB contendo 60 μ g/ml de kanamicina e 50 μ g/ml de cloranfenicol.

4.2.2.2. Estratégia de clonagem das diferentes porções do gene LaTERT

A proteína LaTERT Inteira, a sua região N-terminal e o seu domínio RT foram clonados no vetor de clonagem pCR[®] 2.1 (Invitrogen). Para isso, fragmentos do gene foram amplificados por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos específicos: senso p1_pET_F (5'-CATATGTCCGCCTCGTTTCCA-3') e antisenso p4344_pET_R (5'-AAGCCTTCAAGTCTGCGAGAG-3') para a proteína LaTERT Inteira, senso p1_pET_F (5'-CATATGTCCGCCTCGTTTCCA-3') e antisenso p2338_pET_R (5'-AAGCCTTCATGAGCCACGGGC-3') para a região N-terminal e senso p2338_pET_F (5'-

CATATGGCCCGTGGCTCA–3’) e antisenso p3669_pET_TGA_R (5’-AAGCCTTCAGAGTTCATACGG–3’) para o domínio RT (as seqüências sublinhadas correspondem aos sítios de *NdeI* nos oligonucleotídeos senso e *HindIII* nos antisenso). Esses fragmentos de DNA foram então ligados no vetor pCR[®] 2.1, o qual confere resistência ao antibiótico ampicilina. Bactérias competentes *E. coli* DH5 α foram transformadas com os DNAs plasmidiais por choque térmico e a minipreparação desses DNAs foi realizada utilizando-se o kit Perfectprep[®] Plasmid Mini (Eppendorf).

O domínio RT da proteína LaTERT foi expresso em bactérias *E. coli* utilizando-se o vetor de expressão pET-28a(+) (Novagen) [Studier et al., 1990]. Para a clonagem, os plasmídeos recombinantes e o vetor pET-28a(+) foram digeridos com as enzimas de restrição *HindIII* e *NdeI* de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare). Cada reação foi realizada utilizando-se uma unidade de enzima por micrograma de DNA e incubando-se a 37°C durante 3 horas. Os produtos das digestões foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em cuba contendo tampão de corrida 1X TAE (40 mM Tris-Acetato pH 8,3 e 1 mM EDTA). Os fragmentos de interesse foram isolados e extraídos do gel utilizando-se o kit Perfectprep[®] Gel Cleanup (Eppendorf) de acordo com as recomendações do fabricante.

Os fragmentos contendo o gene truncado LaTERT N-terminal e o gene LaTERT Inteira foram excisados do vetor pCR[®] 2.1, digerindo-se os plasmídeos com as enzimas *NdeI*, cujo sítio de restrição estava inserido no oligonucleotídeo senso utilizado na amplificação, e *SacI*, que estava presente no vetor, de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare). Cada reação foi realizada utilizando-se uma unidade de enzima por micrograma de DNA e incubando-se a 37°C durante 1 hora. Os produtos das digestões foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em cuba contendo tampão de corrida 1X TAE (40 mM Tris-acetato pH 8.3 e 1 mM EDTA) e os fragmentos de interesse foram isolados e extraídos do gel utilizando-se o kit Perfectprep[®] Gel Cleanup (Eppendorf) de acordo com as recomendações do fabricante.

Os fragmentos e vetores previamente digeridos foram ligados em uma reação contendo 100-200 ng do DNA vetor, 200-300 ng do DNA inserto e 1 unidade de T4 DNA ligase (Invitrogen) em tampão de ligação (50 mM Tris-HCl pH 7.6; 10 mM MgCl₂; 1 mM ATP; 1 mM DTT e 5% (w/v) de polietilenoglicol-8000) para um volume final de 20 μ l. Para cada uma das ligações, foram feitos controles contendo todos os reagentes descritos exceto o DNA inserto. As reações e seus respectivos controles foram incubados a 16°C por 16 horas. Para a multiplicação

dos clones recombinantes contendo as construções pET-28a(+)/LaTERT N-terminal e pET-28a(+)/LaTERT Inteira, bactérias competentes *E. coli* DH5 α foram transformadas com os produtos das ligações e os DNAs plasmidiais foram purificados utilizando-se o kit Perfectprep® Plasmid Mini (Eppendorf). As construções foram então inseridas em bactérias competentes BL21(DE3)RP códon plus e as colônias transformantes foram selecionadas em meio seletivo contendo kanamicina e cloranfenicol. Os DNAs plasmidiais foram extraídos utilizando-se o Kit Perfectprep® Plasmid Mini (Eppendorf) de acordo com as especificações do fabricante. A confirmação de que as construções do vetor com os genes de interesse estavam corretas foi realizada através de digestões com enzimas de restrição e por sequenciamento automático do DNA plasmidial utilizando-se os oligonucleotídeos T7 senso e T7 antisenso presentes no vetor pET-28a(+).

Para a obtenção da proteína recombinante em larga escala (somente LaTERT N-terminal), as bactérias que expressaram a proteína de interesse foram inoculadas em 2 litros de meio LB contendo os antibióticos adequados. Após os procedimentos de indução, as bactérias foram ressuspensas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM NaCl; 10 mM EDTA e coquetel de inibidores de proteases), tratadas com 30 μ g/ml de lisozima e sonicadas. As frações solúveis foram separadas das insolúveis por centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C e verificou-se que a proteína de interesse estava sendo expressa de forma insolúvel.

4.2.2.3. Indução da expressão e extração das proteínas recombinantes

Para a expressão da construção pET-28a(+)/LaTERT RT utilizou-se a cepa BL21(DE3)RP códon plus de *E. coli*, cuja expressão do gene de interesse é feita por indução com IPTG. Essa cepa é normalmente utilizada na expressão protéica de genes que contêm códons raros para arginina (R) e prolina (P), pois possui suplementação de RNAs transportadores que codificam esses aminoácidos. As bactérias foram inoculadas em meio LB contendo os antibióticos adequados e permaneceram a 37°C sob agitação de 200 ciclos por minuto até atingirem DO_{600nm} entre 0,8 e 1,0, quando se adicionou 0,5 mM de IPTG para induzir a expressão. Ensaios em pequena escala foram realizados para a determinação da temperatura e do tempo ideais de indução. A expressão da proteína recombinante LaTERT RT foi inicialmente testada a 37°C. Foram coletadas alíquotas antes da adição do IPTG (amostra não-induzida), a cada 1 hora (até 5 h) e 24 h após a indução. As amostras foram submetidas à centrifugação a

14.000 rpm por 2 minutos e os precipitados foram ressuspensos em 50 µl de água e 50 µl de tampão de amostra (50 mM Tris-HCl pH 6,8; 100 mM DTT; 2% SDS; 0,1% azul de bromofenol e 10% glicerol). O DNA das amostras foi quebrado mecanicamente utilizando-se sonicador. Em seguida, as amostras foram incubadas a 100°C por 5 minutos e analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (razão acrilamida:bis-acrilamida 29:1) [Laemmli, 1970]. A eletroforese foi conduzida com o uso do aparato Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad). O gel foi corado durante 30 minutos em solução com 0,25% Coomassie Brilliant Blue R (Bio-Rad) e descorado em solução contendo 30% metanol e 10% ácido acético. A análise dos géis foi realizada através da comparação das bandas da amostra não-induzida com as bandas das amostras coletadas após a indução. Para identificar o tamanho da banda correspondente à proteína induzida, utilizaram-se os marcadores de peso molecular de proteínas “Broad Range” (Bio-Rad) e “Full Range Rainbow” (GE Healthcare) como padrões. Para a obtenção da proteína recombinante em larga escala, as bactérias que expressaram a proteína de interesse foram inoculadas em 250 ml de meio LB contendo os antibióticos adequados. Após os procedimentos de indução, as bactérias foram ressuspensas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM NaCl; 10 mM EDTA e coquetel de inibidores de proteases), tratadas com 30 µg/ml de lisozima e sonicadas. As frações solúveis foram separadas das insolúveis por centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C e verificou-se que a proteína de interesse estava sendo expressa de forma insolúvel. Sendo assim, testou-se a indução dessa proteína recombinante (LaTERT RT) a 25°C para verificar se havia alteração na forma como a proteína seria expressa. O resultado obtido não foi satisfatório.

4.2.2.4. Ressolubilização e purificação da proteína recombinante LaTERT RT

Na primeira tentativa de ressolubilizar e renovar a proteína recombinante LaTERT RT, os precipitados protéicos foram ressuspensos em tampão de lise e ressolubilizados com a adição lenta de uréia até a concentração final de 8 M. As soluções foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram diluídos lentamente sob agitação branda com 100 mM tampão fosfato pH 8,2. Após a troca de tampão para a total retirada da uréia (diálise), as amostras foram novamente centrifugadas para a remoção dos materiais precipitados. As amostras foram analisadas em 10% SDS-PAGE. A proteína recombinante continuou a ficar insolúvel após a diálise.

Em uma nova tentativa de ressolubilizar e renovar a proteína recombinante LaTERT RT as bactérias foram inoculadas em 250 ml de meio LB contendo os antibióticos adequados. Após os procedimentos de indução e de coleta, as bactérias foram ressuspensas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM NaCl; 10 mM EDTA e coquetel de inibidores de proteases), tratadas com 30 µg/ml de lisozima e sonicadas. Descartaram-se os sobrenadantes. A seguir, os “pellets” foram lavados cerca de 4-5 vezes com uma solução contendo 1 M uréia e 1% Triton X-100 de modo a eliminar os *debris* celulares restantes. As frações solúveis foram separadas das insolúveis por centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram descartados. Após as lavagens o precipitado foi pesado e ressuspendido em 50 mM de tampão glicina-NaOH pH 8,0 para uma concentração de proteína de 60 mg/ml. A proteína foi ressolubilizada pela adição de uréia 8M para uma concentração final de 7 M e de 71 µl/l de β-mercaptoetanol, ficando aproximadamente 8 mg/ml de proteína final. As frações solúveis foram separadas das insolúveis por centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. As proteínas contidas nos sobrenadantes foram purificadas na forma desenhovelada em coluna de afinidade HiTrap Chelating HP Column (GE Healthcare) pré-equilibrada em tampão A (50 mM de glicina-NaOH, pH 8,0, 0,5 M NaCl, 25 mM imidazol, 7M uréia). A coluna foi carregada com 100 mM sulfato de níquel. As proteínas recombinantes expressas através do sistema de expressão pET-28a(+) contém uma cauda de 6 histidinas que formam complexo com o íon metálico níquel presente na coluna, permanecendo ligados por afinidade. As proteínas foram eluídas com um gradiente linear de 25 mM – 0,5 M imidazol em tampão A. As frações contendo o fragmento LaTERT RT foram dialisadas contra 100 mM tampão fosfato pH 8,0, 100 mM NaCl e 71 µl/l de β-mercaptoetanol. Devido à alta concentração de sal, a proteína precipitou novamente. Ela foi então centrifugada e o precipitado foi ressuspendido em 50 mM de glicina-NaOH, pH 8,0. Em seguida, adicionou-se uréia para concentração final de 7M de forma a ressolubilizar as proteínas, as quais foram novamente submetidas à diálise contra os tampões 50 mM de glicina-NaOH, pH 8,0, ou 100 mM tampão fosfato e 100 mM NaCl, ambos contendo 71 µl/l de β-mercaptoetanol. As frações solúveis foram separadas das insolúveis por centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C e as frações solúveis foram concentradas em filtros Amicon 30 (Millipore) e analisadas em 10% SDS-PAGE.

4.2.2.5. Protocolo de imunização de coelhos para a obtenção de anticorpos contra LaTERT RT

Para a produção de anticorpos contra as proteínas recombinantes LaTERT RT e LaTERT N-terminal em coelhos, a fração insolúvel dos extratos protéicos contendo as proteínas recombinantes de interesse (~500 µg) foi homogeneizada em 1 X tampão de amostra de SDS-PAGE em tampão fosfato (100 mM, pH 8,2), fervida e aplicada em gel 10% SDS-PAGE. O gel foi imerso em solução a 4°C contendo 150 mM KCl e a banda protéica precipitada foi excisada, macerada em 1 X PBS e emulsificada com 2 X adjuvante completo de Freund (vol/vol) (Sigma). Antes da primeira injeção, foi feita uma sangria cujo soro foi chamado de soro pré-imune. A suspensão foi injetada subcutaneamente em coelhos fêmeas Nova Zelândia durante cerca de 2 meses. As injeções subcutâneas foram repetidas mais duas vezes, com 600 µg e 700 µg de proteína e 2 X adjuvante incompleto de Freund (vol/vol) (Sigma), após o que foi realizada uma sangria de prova e os anticorpos foram testados por “Western blotting”. Comprovada a produção dos anticorpos contra as proteínas recombinantes de interesse, foi feita mais uma nova injeção subcutânea com 700 µg de proteína antes da sangria total dos coelhos. Após cada sangria, o sangue foi incubado por 1-5 horas (dependendo do volume obtido) a 37°C para que pudesse coagular e liberar o soro. O soro foi então coletado separadamente das hemácias e incubado por 30 minutos a 65°C para inativar o sistema complemento.

4.2.2.6. Preparação dos extratos de proteínas S100

Extratos S100 de culturas em fase logarítmica de parasitas *L. amazonensis* na forma promastigota foram preparados segundo protocolo descrito anteriormente [Cano et al., 1999]. Resumidamente, aproximadamente 4×10^{10} parasitas foram centrifugados a 8.000 rpm por 15 minutos a 4°C e lavados em 1X PBS ("Phosphate-buffered-saline": 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ e 2 mM KH₂PO₄ pH 7,4) gelado suplementado com 2% de glicose. O precipitado foi ressuspensionado em 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 e 5 mM 2-mercaptoetanol) suplementado com 1X coquetel de inibidores de proteases SetIII (Calbiochem) e incubado no gelo por 30 minutos. As células foram lisadas por maceração mecânica na presença de nitrogênio líquido e a lise foi verificada por microscopia óptica de fase reversa. O produto da lise foi centrifugado a 18.000 rpm por 20 minutos a 4°C e, a seguir, ultracentrifugado a 100.000 X g em

um rotor Beckman 90Ti por 90 minutos a 4°C. O extrato foi congelado rapidamente em nitrogênio líquido, aliquotado e estocado a -70°C. A concentração de proteínas foi determinada utilizando-se o método de Bradford (Bio-Rad).

4.2.2.7. Imunodeteção da LaTERT nativa e de suas formas truncadas por “Western Blotting”

Extratos protéicos brutos (S100) ou semi-purificados em colunas de DEAE Sepharose, assim como a proteína recombinante LaTERT RT, foram aplicados em géis de SDS-PAGE e transferidos para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) em 1 X tampão de transferência (48 mM Tris-Base, 39 mM glicina, 20% metanol, 0,0375% SDS) por 16 h a 4°C utilizando o aparato Trans-Blot Cell [Sambrook and Russel, 2001]. A detecção das proteínas foi realizada utilizando-se o kit “Amplified Alkaline Phosphatase Immun-Blot Assay Kit” (Bio-Rad), com diluições de 1:1000 do anticorpo primário (anti-LaTERT RT ou anti-LaTERT N-terminal) e 1:3000 do anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina).

4.2.2.8. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)

O ensaio de ChIP foi realizado como descrito em Lira et al. [2007b]. Resumidamente, cerca de $0,8 \times 10^8$ parasitas em fase log de crescimento foram fixados em 1% formaldeído. As células foram lavadas com 1 X PBS e ressuspensas em tampão de lise. As células foram lisadas por sonicação e o DNA foi quebrado, gerando fragmentos de 0,2-0,5 kb. Como controle, foram separadas alíquotas correspondendo a 1% e 10% do total de células utilizadas. A cromatina foi diluída em tampão de imunoprecipitação e pré-clareada por 2 horas a 4°C sob agitação com 30 µl de Proteína A Sepharose (GE Healthcare) pré-equilibrada. A seguir, a cromatina foi incubada por 16 horas a 4°C sob agitação com 40 µl de anticorpo anti-LaTERT RT. Como controle, também foram feitas reações de IP na ausência de anticorpo e utilizando-se o soro pré-imune. Em seguida, 100 µl de Proteína A Sepharose foram adicionados à IP e incubados por 3 horas a 4°C. As IPs foram lavadas a 4°C, uma vez com o tampão 1, 3 vezes com o tampão 2, uma vez com tampão de lítio e 2 vezes com 1 X TE. A cromatina imunoprecipitada foi eluída da Proteína A Sepharose após incubação com o tampão de eluição por 15 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Nos passos seguintes, os controles 1% e 10% foram tratados juntamente com as amostras de IP. O “cross-linking” foi revertido pela incubação a 65°C por

pelo menos 4 horas na presença de 0,3 M NaCl. As amostras foram tratadas com RNase A por 30 minutos a 37°C e com proteinase K por 1 hora a 37°C. O DNA foi extraído com fenol/clorofórmio (1:1), precipitado, lavado e ressuspendido em água. O DNA foi desnaturado a 95°C por 10 minutos e transferido para membranas de nylon Hybond-N⁺ (GE Healthcare) umedecidas com 2 X SSC. As membranas foram tratadas com tampão de desnaturação por 15 minutos, com tampão de neutralização por mais 15 minutos e hibridizadas com os oligonucleotídeos Tel1-C (5'-(CCCTAA)₃-3'), Tel1 (5'-(TTAGGG)₃-3') e DNA rico em GT (5'-(GT)₁₅-3') marcados com [γ -³²P]ATP como descrito previamente [Conte and Cano, 2005]. A membrana foi exposta a um “screen” de phosphorimager por no mínimo 16 horas (Fuji Photo Film Co. LTD). O “screen” foi lido no Fuji Film Bas – 1800 II.

4.2.3. Resultados e Discussão

4.2.3.1. Os fragmentos correspondentes ao domínio RT e à região N-terminal do gene LaTERT foram amplificados e clonados

Fragmentos contendo o domínio RT e a região N-terminal do gene LaTERT, assim como a proteína LaTERT Inteira, foram amplificados por PCR e clonados no sítio de poli-clonagem do vetor pET-28a(+) (Novagen) visando a expressão de proteínas recombinantes contendo uma cauda de poli-histidinas (“6X His-tag”) no N-terminal. Apesar do fragmento LaTERT Inteira ter sido amplificado e clonado de maneira correta, segundo verificado por PCR e por seqüenciamento (dados não mostrados), as bactérias expressavam somente uma proteína truncada de aproximadamente 80 kDa, enquanto o esperado era uma proteína recombinante com o dobro do tamanho. A Figura 17A apresenta um esquema da seqüência de aminoácidos da proteína LaTERT e dos fragmentos N-terminal e RT dessa proteína que foram amplificados e clonados. Na Figura 17B, pode-se verificar a amplificação por PCR dos fragmentos correspondentes ao domínio RT (linha 1) e à região N-terminal (linha 2) do componente TERT de *L. amazonensis*.

LaTERT

N-terminal
(2,346 pb)

RT
(1,343 pb)

1 778/782 1225 1,450

GQ CP QFP T 1 2 A B C D E C-terminal

Agarose gel electrophoresis image showing RT-PCR products. The gel has four lanes labeled M, 1, 2, and 3 at the bottom. Lane M is a DNA ladder with markers at 12.0, 3.0, 2.0, 1.65, 1.0, 0.85, 0.65, 0.4, and 0.2 kb. Lane 1 shows a band at approximately 1.65 kb labeled 'RT'. Lane 2 shows a band at approximately 2.5 kb labeled 'N-terminal'. Lane 3 is empty.

57

4.2.3.2. As proteínas recombinantes LaTERT RT e LaTERT N-terminal foram expressas de forma insolúvel em sistema bacteriano

As construções pET-28a(+)/LaTERT RT e pET-28a(+)/LaTERT N-terminal foram utilizadas para transformar bactérias *E. coli* da cepa BL21(DE3)RP códon plus.

Os testes iniciais de expressão e de indução do domínio RT da proteína LaTERT demonstraram que a proteína recombinante apresentou tamanho aproximado de 50 kDa e foi induzida a partir da primeira hora após a adição de 0,5 mM IPTG (Figura 18A, linhas 2-7). A melhor condição de indução foi obtida após 3 horas da adição de IPTG (Figura 18A, linha 4). Além disso, a proteína recombinante LaTERT RT permaneceu na fração insolúvel (precipitado) do extrato induzido (Figura 18B, linha 4).

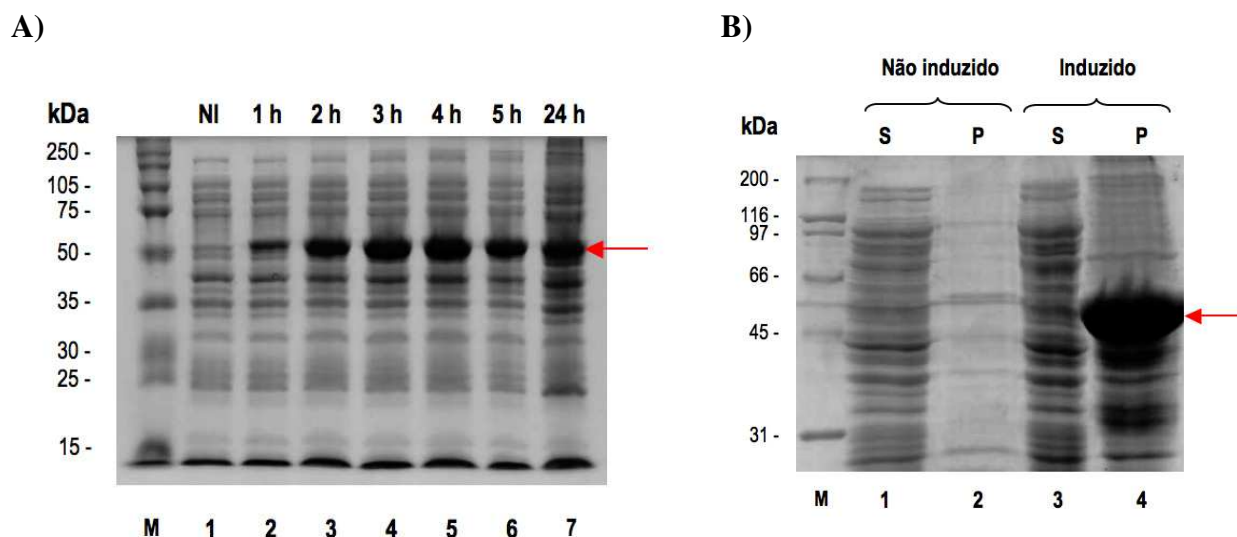


Figura 18 - Testes de indução e de solubilidade da proteína LaTERT RT. Em A) e B), os extratos protéicos foram fracionados em géis 10% SDS-PAGE e corados com azul de “Coomassie”. **A)** Análise das diferentes frações do extrato protéico durante o teste de indução da proteína truncada LaTERT RT. O teste foi realizado a 37°C com bactérias coletadas antes da indução (NI, linha 1), 1 a 5 horas (linhas 2 a 6) e 24 horas (linha 7) após a indução. M, marcador de peso molecular “Full Range Rainbow”. **B)** Análise das diferentes frações do extrato protéico após a indução da proteína LaTERT RT com 0,5 mM IPTG. Linha 1, sobrenadante do extrato não induzido (S); linha 2, precipitado do extrato não induzido (P); linha 3, sobrenadante do extrato induzido (S); linha 4, precipitado do extrato induzido (S). Pode-se verificar que a proteína LaTERT RT permaneceu na fração insolúvel do extrato. M, marcador de peso molecular “Broad Range”.

A proteína recombinante correspondente à região N-terminal da proteína LaTERT foi expressa a partir da primeira hora de indução (Figura 19A, linhas 2 a 7) e continha um peso molecular aparente de aproximadamente 80 kDa. A melhor condição de indução foi obtida após 3 horas da adição de IPTG (Figura 19A, linha 4). Verificou-se ainda que a proteína LaTERT N-terminal, assim como a LaTERT RT, também foi encontrada principalmente na fração insolúvel dos extratos (Figura 19B, linha 2). Para a expressão da proteína LaTERT N-terminal em larga escala, para a posterior inoculação em coelhos, utilizaram-se 2 litros de cultura e a expressão foi induzida com 0,5 mM de IPTG por 3 horas a 37°C.

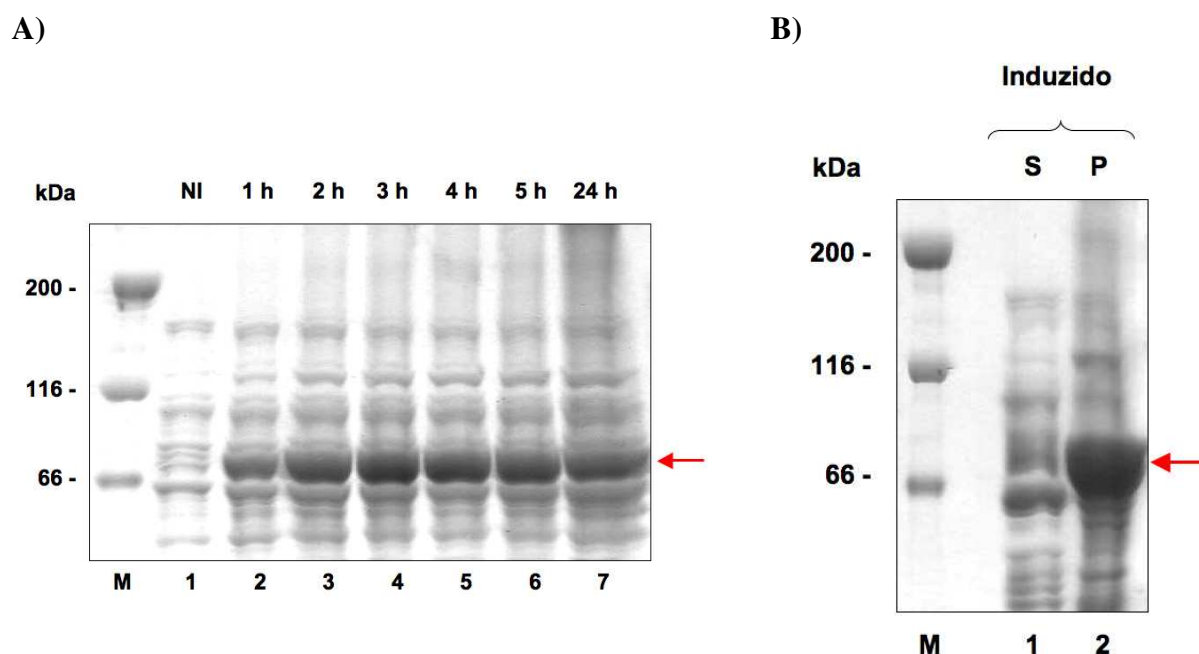


Figura 19 - Expressão e teste de solubilidade da proteína LaTERT N-terminal em bactérias *E. coli* BL21 (DE3) RP. Em A) e B), os extratos protéicos foram fracionados em géis 10% SDS-PAGE e corados com azul de “Coomassie”. A) A expressão da proteína recombinante foi induzida na presença de 0,5 mM IPTG a 37°C. As amostras foram coletadas antes da indução (NI, linha 1), entre 1 e 5 horas e até 24 horas (linhas 2 a 7) após a indução com IPTG. A banda contendo a proteína recombinante LaTERT N-terminal tem um peso molecular aparente de ~80 kDa. M, marcador de peso molecular “Pre-stained Broad Range”. B) Teste de solubilidade da proteína LaTERT N-terminal expressa: linha 1, fração solúvel induzida (S); linha 2, pellet induzido (P). A proteína recombinante foi encontrada somente na fração insolúvel dos extratos induzidos (P). M, marcador de peso molecular “Pre-stained Broad Range”.

Para purificar a proteína recombinante LaTERT RT, a fração insolúvel do extrato protéico foi ressolubilizada com a adição de 8 M uréia final e passada pela coluna de afinidade HiTrap Chelating HP. Na Figura 20, pode-se visualizar um gel 10% SDS-PAGE onde foram aplicados: o precipitado contendo a proteína recombinante LaTERT RT (linha 1), a fração protéica ressolubilizada antes de passar pela coluna HiTrap Chelating (linha 2), e as diferentes frações eluídas da coluna (linhas 3 a 8 e 10 a 15). Apesar de não conseguir purificar completamente a proteína de interesse, pode-se verificar uma purificação parcial da proteína nas frações presentes nas linhas 14 e 15. As bandas protéicas que aparecem abaixo da proteína LaTERT RT podem ser subprodutos gerados por degradação.

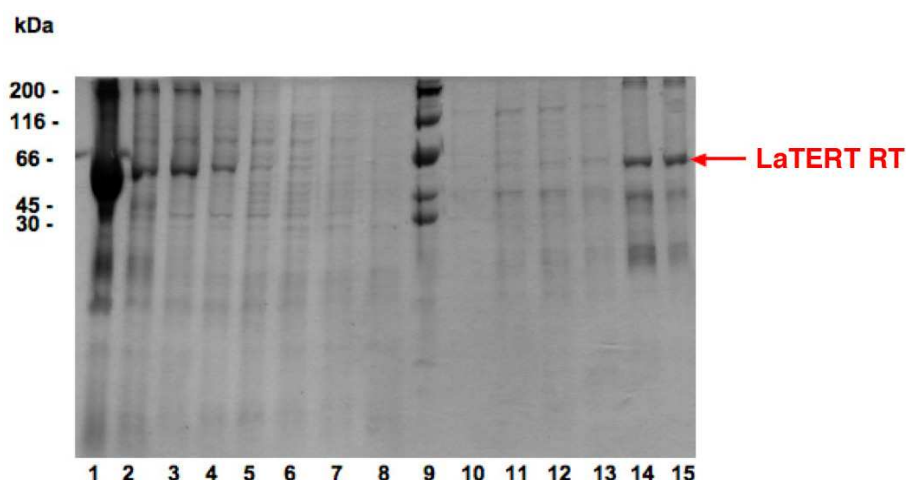


Figura 20 - Análise da proteína recombinante LaTERT RT purificada em coluna de afinidade “HiTrap Chelating”. As amostras protéicas foram fracionadas em géis 10% SDS-PAGE e coradas com azul de “Coomassie”. Linha 1, precipitado contendo a proteína recombinante LaTERT RT; linha 2, fração protéica ressolubilizada antes de passar pela coluna HiTrap Chelating; linhas 3 a 8 e 10 a 15, diferentes frações eluídas da coluna com concentrações crescentes de imidazol (25 mM a 0.5 M); linha 9, marcador de peso molecular “Low Range”. Pode-se verificar a presença da proteína LaTERT RT de forma semi-purificada (seta) nas frações das linhas 14 e 15.

Após a purificação parcial da proteína recombinante LaTERT RT por coluna de afinidade, realizou-se diálise das frações positivas contra dois diferentes tampões: 100 mM tampão fosfato pH 8,0 contendo 100 mM NaCl e 50 mM glicina-NaOH pH 8,0. Na Figura 21, pode-se verificar que a proteína LaTERT RT precipitou novamente após a diálise, permanecendo portanto na fração insolúvel (linha 3).

Outro teste de ressolubilização foi realizado induzindo-se a expressão da proteína recombinante a 25°C. A expressão foi induzida novamente com sucesso nesta condição, porém a proteína continuou na fração insolúvel do extrato (dados não mostrados).

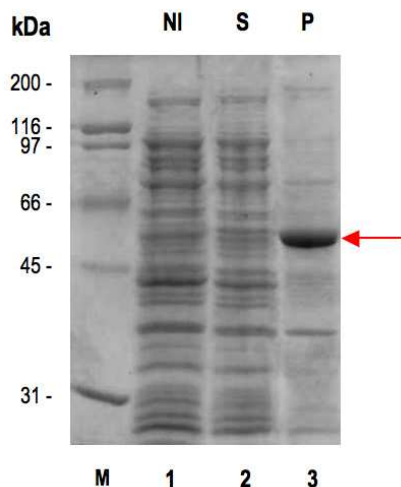


Figura 21 - Teste de ressolubilização e renaturação da proteína LaTERT RT. Análise por SDS-PAGE de diferentes frações do extrato protéico após a adição de 8 M uréia final e diálise com 100 mM tampão fosfato. Linha 1, extrato não induzido (NI); linha 2, fração solúvel após a diálise (S); linha 3, fração insolúvel após a diálise (P). Pode-se verificar que a proteína LaTERT RT continuou na fração insolúvel do extrato mesmo após a tentativa de renaturação. M, marcador de peso molecular “Broad Range”.

4.2.3.3. A proteína LaTERT nativa foi reconhecida pelo anticorpo anti-LaTERT RT em experimentos de “Western Blotting”

Após a produção e o isolamento de soros de coelho contendo as proteínas recombinantes LaTERT RT e LaTERT N-terminal, realizaram-se experimentos de “Western blotting” para testar a qualidade dos anticorpos presentes nesses soros. Pequenas quantidades dos precipitados contendo as proteínas recombinantes foram aplicadas em géis 10% SDS-PAGE, fracionados e transferidos para membranas de nitrocelulose. Essas membranas foram então incubadas com os respectivos anticorpos policlonais. A imunodeteção revelou que o anticorpo anti-LaTERT RT foi capaz de detectar a sua respectiva proteína recombinante (Figura 22A). Já o anticorpo anti-LaTERT N-terminal apresentou alto grau de reação cruzada contra proteínas do extrato bacteriano, mostrando-se inespecífico até mesmo no reconhecimento da proteína recombinante que lhe deu origem (dados não mostrados). Assim, todos os experimentos a seguir foram realizados utilizando-se somente o anticorpo anti-LaTERT RT.

Para verificar se este anticorpo era capaz de detectar a proteína LaTERT nativa, extratos protéicos brutos (S100) ou semi-purificados em colunas de DEAE Sepharose foram fracionados em géis 8% SDS-PAGE e submetidos a experimentos de “Western blotting” utilizando-se o

anticorpo primário anti-LaTERT RT. Uma banda protéica de aproximadamente 160-180 kDa apareceu reagindo mais fortemente contra o anticorpo anti-LaTERT RT tanto na fração protéica total (S100, linha 1), quanto na fração eluída da coluna de DEAE Sepharose (linha 2), o que é compatível com o tamanho esperado para a telomerase de *L. amazonensis* (~158 kDa) [Giardini et al., 2006] (Figura 22B, compare linhas 1 e 2). Este resultado corrobora a hipótese de que o gene do componente LaTERT recentemente identificado e clonado em nosso laboratório [Giardini et al., 2006] é mesmo o gene responsável por codificar o componente protéico da telomerase de *L. amazonensis*. As outras bandas protéicas que aparecem na figura podem ser resultado de “splicing” alternativo ou produto de degradação da telomerase durante a preparação do extrato.

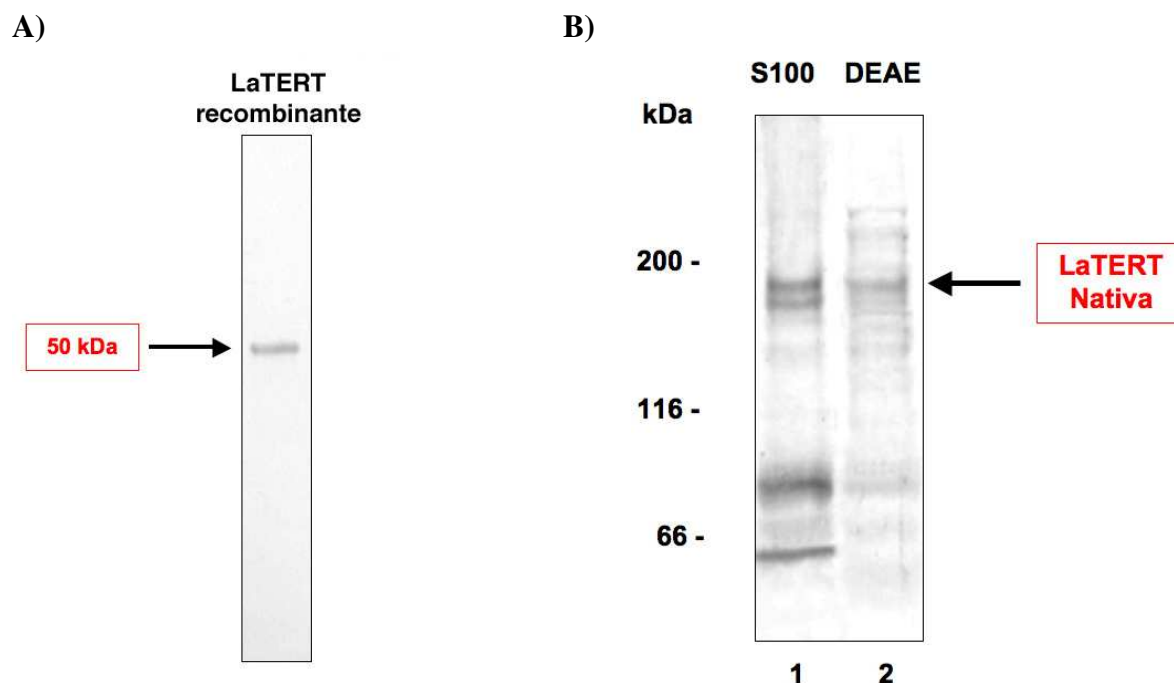


Figura 22 – Experimentos de “Western blotting” utilizando anticorpos policlonais de coelho produzidos contra a proteína recombinante LaTERT RT. Em A) e B), as proteínas de interesse foram fracionadas em géis 8-10% SDS-PAGE e foram transferidas para membranas de nitrocelulose, sendo então submetidas à imunodeteção. **A)** Linha 1, proteína recombinante LaTERT RT reconhecida pelo anticorpo. Esta proteína apresenta uma cauda N-terminal contendo seis histidinas e tem aproximadamente 50 kDa. **B)** Linha 1, extrato total (S100) de *L. amazonensis*, e linha 2, eluato de 400 mM NaAc de uma coluna de DEAE Sepharose utilizada para purificar o extrato S100 mostrado na linha 1. A proteína LaTERT nativa tem peso molecular aparente de ~160 kDa.

4.2.3.4. A telomerase de *L. amazonensis* interage com o DNA telomérico *in vivo*

Para estudar a interação da telomerase de *L. amazonensis* com o DNA telomérico *in vivo*, realizou-se um ensaio de imunoprecipitação de cromatina (Figura 23). Neste experimento, o DNA total fragmentado por sonicação foi imunoprecipitado com i) o soro anti-LaTERT RT, ii) o soro pré-imune, e iii) 1% do DNA total utilizado em cada imunoprecipitação (“Input”). Em seguida, os DNAs imunoprecipitados foram hibridizados com as sondas Tel1-C e Tel1, representando as duas fitas de DNA telomérico, e uma sonda de DNA não telomérico, denominado DNA rico em GT ou (GT)_n (Material e Métodos) (Figura 23). Como mostrado na Figura 23, o DNA imunoprecipitado com o anticorpo anti-LaTERT RT só reconheceu a sequência complementar à repetição telomérica TTAGGG (sonda Tel1-C), indicando que a proteína LaTERT nativa é capaz de interagir *in vivo* com a simples-fita rica em G dos telômeros de *L. amazonensis*. O soro pré-imune do coelho utilizado como controle não foi capaz de imunoprecipitar nenhuma proteína que interage com os telômeros do parasita (Figura 23).

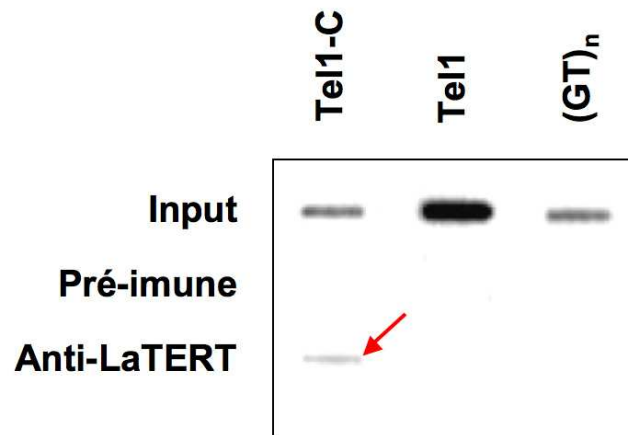


Figura 23 - A telomerase de *L. amazonensis* co-imunoprecipita *in vivo* com a sequência telomérica rica em G. “Slot-blot” contendo amostras imunoprecipitadas em experimento de ChIP. O DNA de promastigotas de *L. amazonensis* em fase log de crescimento foi imunoprecipitado utilizando-se os anticorpos anti-LaTERT RT ou soro pré-imune. Reações controle foram realizadas na ausência de anticorpo (dados não mostrados). O “Input” corresponde a 1% do DNA total fixado à cromatina antes das imunoprecipitações. Os DNAs foram hibridizados com as sondas Tel1-C, Tel1 ou (GT)_n (oligonucleotídeo rico em GT) marcadas com [γ -³²P]ATP.

4.2.4. Conclusões deste capítulo

- De modo similar ao que acontece com quase todas as telomerasas já descritas até hoje, os genes TERT de *Leishmania* spp. apresentam todos os motivos canônicos característicos das RTs convencionais e das telomerasas [Nakamura et al., 1997, Bryan et al., 1998, Xia et al., 2000, Giardini et al., 2006].
- *Leishmania*, juntamente com *Cryptosporidium parvum* [número de acesso EAK88680] e *Plasmodium falciparum* [Figueiredo et al., 2005], apresenta um dos maiores componentes TERT já descritos até hoje, com 1450 aminoácidos.
- Os genes TERT estão presentes em cópia única no genoma e estão localizados nos maiores cromossomos de 4 diferentes espécies de *Leishmania*.
- Análises filogenéticas indicaram que os componentes TERT de *Leishmania* spp. apresentam muito maior homologia entre si (82-95% identidade) do que com componentes TERT de outros protozoários e eucariotos. Sugere ainda que as TERTs dos tripanosomatídeos podem representar um elo de ligação entre os ramos mais antigos e os ramos mais recentes da evolução das telomerasas.
- A produção de anticorpos policlonais específicos contra duas diferentes porções do gene LaTERT possibilitou a realização de ensaios de “Western blotting” e imunoprecipitação de cromatina. Os ensaios de “Western blotting” mostraram que o anticorpo policlonal produzido contra a proteína recombinante foi capaz de reconhecer uma proteína nativa de *Leishmania* com peso molecular semelhante ao predito para a proteína LaTERT codificada pelo gene do parasita (~ 158 kDa). Já os ensaios de imunoprecipitação de cromatina puderam evidenciar que a telomerase de *Leishmania* liga-se *in vivo* à sequência telomérica rica em G dos telômeros.

5. CAPÍTULO II

5.1. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA TELOMERASE DE *Leishmania (L.) amazonensis*

5.1.1. Resumo em português

Telômeros são complexos de DNA-proteínas que protegem os cromossomos lineares. Em *Leishmania* spp., o DNA telomérico é composto pela sequência conservada repetitiva TTAGGG e é replicado pela ação da telomerase. A telomerase é um complexo enzimático multissubunidades composto por um componente transcriptase reversa (TERT), uma molécula intrínseca de RNA (TERT) e proteínas associadas. Ela assegura a completa replicação do DNA através da adição de novas sequências teloméricas à fita rica em G. A enzima também funciona como parte do complexo de ordem maior que regula os estados protegido e desprotegido dos telômeros.

Extratos protéicos de *L. amazonensis* contendo atividade de telomerase foram purificados utilizando métodos cromatográficos complementares. A atividade enzimática foi testada em cada passo da purificação utilizando o ensaio “Two-tube TRAP”. Os resultados mostraram que a atividade enzimática é encontrada nas frações purificadas pelas cromatografias de troca iônica (DEAE Sepharose), de afinidade por heparina e de gel filtração. A atividade foi altamente enriquecida após cromatografia de afinidade utilizando um oligonucleotídeo de DNA telomérico rico em G. Quando um oligoribonucleotídeo 2’*O*-metil complementar ao putativo molde do componente TER de *L. amazonensis* foi utilizado na purificação de afinidade, pouca ou nenhuma atividade enzimática foi eluída da resina, sugerindo que a interação entre a telomerase de *L. amazonensis* e este oligoribonucleotídeo é tão forte que não ocorre a dissociação proteína-ligante nas condições de eluição gentis necessárias para manter a atividade enzimática.

5.1.2. ARTIGO II: *Leishmania amazonensis* telomerase: purification and biochemical properties. Giardini, M.A., Lira, C.B.B., Cano, M.I.N.

***Leishmania amazonensis* telomerase: purification and biochemical properties**

Giardini, M.A.^{1,2}, Lira, C.B.B.^{1,2} and Cano, M.I.N.^{1,*}

¹Laboratório de Telômeros, Departamento de Genética, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, *Brazil*; ²Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, *Brazil*.

**Communicating author.* Departamento de Genética, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Distrito de Rubião Júnior s/n, CEP 18618-000, Botucatu, SP, Brazil. Tel.: +55 14 3811 6229.

E-mail address: micano@ibb.unesp.br (M. I. N. Cano)

ABSTRACT

Telomeres are the protein-DNA complexes that protect linear chromosomes. In *Leishmania* spp. the telomeric DNA is composed by the conserved TTAGGG repeated sequence and is replicated by telomerase. Telomerase is a multisubunit complex, composed by a reverse transcriptase component (TERT), an intrinsic RNA molecule (TER) and associated proteins. It ensures the complete DNA replication by adding new telomeric sequences to the G-rich strand. The enzyme also works as part of the higher order complex that regulates the capping/uncapping telomere states.

Protein extracts of *L. amazonensis* with telomerase activity were purified using combined chromatography columns. Enzyme activity was tested in each purification step using the “Two-tube TRAP” assay. The results showed that enzyme activity is found in fractions purified by ion exchange (DEAE Sepharose), Heparin affinity and gel filtration chromatographic methods. The activity was greatly enriched after affinity purification using a G-rich telomeric DNA oligonucleotide chromatography. When a 2’*O*-methyl oligoribonucleotide complementary to the putative *L. amazonensis* TER template was used in the affinity purification, little or no enzyme activity was eluted from resin, suggesting that the interaction between *L. amazonensis* telomerase and this oligoribonucleotide is such high that it does not dissociate using gentle elution conditions necessary to maintain enzyme activity.

INTRODUCTION

Telomeres are the physical ends of linear chromosomes (Blackburn, 2005). They are specialized structures responsible for maintaining the genome integrity and stability by avoiding end-to-end fusions and degradations by exonucleases (Blackburn, 2005).

Some insects rely on retrotransposon-mediated recombination to replace DNA at chromosome termini and 5-10% of human tumors maintain telomeres via telomere-telomere recombinations (Pardue and DeBaryshe, 2003, Reddel, 2003). However, in most of the eukaryotic species, telomeres are replicated by the ribonucleoprotein enzyme telomerase (Greider, 1998). The enzyme complex is composed by a reverse transcriptase component (telomerase reverse transcriptase – TERT), a RNA component (telomerase RNA – TER) and several associated proteins (Harrington et al., 1997, Blackburn, 2005, Eugster et al., 2006). At least *in vitro*, only the TERT and the TER components are necessary to ensure enzyme activity, although the regulatory proteins are also essential for *in vivo* telomerase function (Weinrich et al., 1997, Masutomi et al., 2000).

TERT is a specialized RNP that adds new telomeric repeats to the 3' G-overhang chromosome ends by copying a short template sequence present in its RNA component. Subsequently, the enzyme dissociates or translocates toward the end of the chromosome in order to continue adding new telomeric repeats (Kelleher et al, 2002). The TERT component has typical reverse transcriptase (RT) domains responsible for its catalytic activity (central and C-terminal regions) and several other essential conserved domains present mostly in the N-terminal region of the protein (Bryan et al., 1998, Xia et al., 2000). This unusual large N-terminal extension is found in all TERTs and it was shown to be involved in binding of the RNA subunit (Xia et al., 2000, Bryan et al., 2000, Lai et al., 2001), which is critical to telomerase function (Blackburn, 2001), to provide the anchor site for the telomeric DNA substrate (Lue, 2005) and to recruit telomerase associated proteins, such as the Est3p, in yeast (Friedman et al., 2003, Jacobs et al., 2006).

Despite the evolutionary distances, the composition and structure of telomerase is similar from yeast to man (Chen and Greider, 2004, Smogorzewska and de Lange 2004, Harrington, 2005). Previous studies have shown that telomerase activity can be detected in extracts from ciliates (Greider and Blackburn, 1985), vertebrates (Morin, 1989), yeasts (Cohn and Blackburn,

1995), plants (MacKnight et al., 1997), nematodes (Magenat et al., 1999) and insects (Sasaki and Fugiwara, 2000). In mammals, telomerase can be readily detected in tumors and in highly proliferative tissues (Kim et al., 1994), while is not detected in most of the somatic tissues. In 1996, Lingner and Cech purified *Euplotes aediculatus* telomerase using heparin and 2' *O*-methyl affinity purified chromatographies, finding polypeptides with apparent molecular masses of 120 kDa and 43 kDa (the latter a doublet) that copurified with telomerase activity. Enzyme activity was also detected in total protein extracts of asexual erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* (early ring and schizont) (Aldous et al., 1998). Cano and colleagues (1999) were able to detect telomerase activity in extracts from the insect form of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania* spp. by using both a modification of the one-tube telomere repeat amplification protocol and the two-tube protocol. They found that the activity in *T. brucei* extracts was sufficiently robust to enable its detection in a direct assay of telomerase, besides its enzyme processivity was found to be low. They were able to suggest a possible 9 nt templating domain sequence for its telomerase RNA. More recently, Muñoz and Collins (2004) investigated the regulation and the biochemical features of *T. cruzi* telomerase, showing that it is active in extracts from multiple developmental stages of the parasite life cycle and suggesting that the catalytically active enzyme is a large ribonucleoprotein complex with an internal RNA template identical to that of the *T. brucei* TER (Cano et al., 1999).

In the present report, we characterized the *L. amazonensis* telomerase activity using affinity purified protein extracts. A polypeptide of apparently ~160 kDa was shown to co-purify with enzyme activity and could be detected after fractionation in a Coomassie-stained SDS-PAGE. These data corroborate our previous results, since this polypeptide has the same predicted size of the protein encoded by the *Leishmania* TERT gene (Giardini et al., 2006).

The purification and characterization of the biochemical features of *Leishmania* telomerase is of great importance, since telomerase and its intrinsic components could be used as targets for the development of a parasite-specific therapy.

MATERIAL AND METHODS

***L. amazonensis* promastigote cultures**

Promastigotes of *L. amazonensis* strain MHOM/BR/73/M2269 were cultivated in exponential growth in M199 (Cultilab), supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (Cultilab) and 1 X Antibiotic/Antimycotic solution (GIBCO) at 28 °C.

Preparation of *L. amazonensis* protein extracts

Preparation of total protein extracts was performed as described previously (Cano et al., 1999). Briefly, approximately 4×10^{10} promastigotes were collected by centrifugation and washed in ice-cold phosphate-buffered saline supplemented with 2% glucose (PBS-G). The pellet was 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 and 5 mM 2-mercaptoethanol) containing 1 X protease inhibitor cocktail SetIII (Calbiochem) followed by incubation for 30 min on ice. The cells were lysed upon mechanic maceration in the presence of liquid nitrogen and were pelleted at 18,000 rpm during 20 min. The suspension was cleared by centrifugation at 4°C for 1h and 30 min in a Beckman 90Ti rotor at 100,000 Xg. The extract was quick-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The protein concentration was determined by the Bradford method (Bio-Rad).

Purification of telomerase activity using a 2'-O-methyl oligoribonucleotide affinity column

Approximately 20 mg of total protein was applied onto a DEAE Sepharose Fast Flow column equilibrated with 1X TMG containing 300 mM NaOAc. Enzyme activity was eluted with step salt gradient 400-700 mM NaOAc in 1X TMG. Column fractions were desalted to 50-60 mM NaOAc with 1X TMG, concentrated in Amicon 30 filter membranes (Millipore) and tested in Two-tube TRAP assay for enzyme activity (Cano et al., 1999). Fractions containing telomerase activity were pooled and loaded onto a 1 ml Heparin HiTrap column (GE Healthcare). Telomerase was eluted with 60 to 450 mM KCl, desalted to 50 mM KCl with 1X TMG, concentrated in Amicon 30 filter membranes and tested for enzyme activity in Two-tube TRAP assay.

Fractions containing telomerase activity were pooled and loaded onto an antisense affinity purification column using a 5' biotinylated chimeric oligonucleotide composed by a DNA and a 2'*O*-methyl RNA sequence complementary to three repeats of the putative TbTER and TcTER template regions (Cano et al., 1999, Muñoz and Collins, 2004 and Table 1). About 1.5 nmol of this oligonucleotide was coupled to NeutrAvidin beads (Pierce) pre-equilibrated in 1X Binding Buffer (25 mM HEPES pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA pH 8.0, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100, 0.5 mM DTT) containing 300 mM KCl. Telomerase was eluted using 2.5 X excess of the displacement oligonucleotide (3.75 nmol) complementary to the entire length of the 2'*O*-methyl similarly as described (Lingner & Cech, 1996, Schnapp et al., 1998, Muñoz and Collins, 2004). Two-tube TRAP assays were also done using beads containing telomerase bound to the 2'*O*-methyl oligonucleotide. The protein content of each chromatography was determined using the Bradford Reagent (Bio-Rad).

Table 1

Oligonucleotides used in Two-tube TRAP assay and affinity chromatography experiments

Oligonucleotide	Sequence
TS	5' - AATCCGTCGAGCAGAGTT - 3'
Cx-ext	5' - GTGCCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA - 3'
TSR8	5' - AG(GGTTAG) ₈ - 3'
2' <i>O</i> -methyl	5' biotin -CTAGACCTGTCATCAmGmGmGmUmUmAmGm GmGmUmUmAmGmGmGmUmUmAmGmGmGm - 3'
Displacement oligo	5' - CCCTAACCTAACCTAACCTGATGACAGGTCTAG - 3'
G-DNA	5' biotin - GTAATACGACTCTTAGGGTTAGGGTTAGGG - 3'

Purification of telomerase activity using a telomeric G-rich DNA affinity column

DEAE fractions containing telomerase activity were also loaded onto an affinity column containing a 5'-biotinylated G-rich telomeric oligonucleotide (G-DNA). This oligonucleotide also has a linker between the 5'-biotin and the telomeric sequences (Table 1). NeutrAvidin beads (Pierce) were pre-equilibrated in 1X Binding Buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, pH 8.0, 10% glycerol) containing 100 mM KCl and 0.5 mM DTT and were coupled with 1.5 nmol of G-DNA oligonucleotide by incubation for 1 hour at 4°C. The coupled beads were incubated with 1X Binding Buffer containing 2.4 µg Poli(dI-dC), 1:1000 Protease Inhibitor Cocktail Pre-Set III (Calbiochem), 96 U RNaseOUT (Invitrogen) and about 1500 µg of DEAE Sepharose positive fractions and the binding reaction was carried out overnight at 4°C under agitation. After binding reaction, the beads were washed with 10 column volumes of 1X Binding Buffer and telomerase was eluted using 1X Binding Buffer containing 600 mM or 2M KCl and supplemented with 0.5 mM DTT and 20 U RNaseOUT (Invitrogen). The eluted fractions were desalted and concentrated using Amicon 30 filter membranes (Millipore).

Purification of telomerase activity using gel filtration chromatography

DEAE and G-DNA fractions containing telomerase activity were pooled and pre-treated with 10 U pancreatic deoxyribonuclease I (DNase I, GE Healthcare) for 30 min at 0°C to eliminate any possibility of DNA contamination. Samples were concentrated in Amicon 30 filter membranes, equilibrated in 1X TM containing 500 mM NaCl and loaded onto a pre-equilibrated Superose 6 PC 3.2/30 column (GE Healthcare). Fractions of 200 µl each were collected, concentrated in Amicon 30 filter membranes and pooled as follows: aliquots 1-4, 5-8, 9-13, 14-16 and 17-20.

Telomerase activity using Two-tube TRAP assays

Telomerase activity was assayed by the Two-tube TRAP method as described before (Cano et al., 1999) using column fractions or affinity chromatography beads as the telomerase source. The oligonucleotides used in these reactions (TS and Cx-ext) are shown in Table 1.

RESULTS AND DISCUSSION

Leishmania telomerase is enriched and binds tightly to the 2'-O-methyl oligoribonucleotide

The *L. amazonensis* telomerase activity present in nuclear extracts was first enriched by ion exchange chromatography on a DEAE Sepharose Fast Flow column (Fig. 1) and subsequently by affinity purification on a Heparin HiTrap column (Fig. 2). DEAE fractions eluted with 400 mM – 600 mM NaAc contained telomerase activity as demonstrated by Fig. 1 (lane 3) and previous results (data not shown). The pre-treatment of the DEAE fractions with RNase A showed the presence of contaminants whose activities co-purified with telomerase (see RNase resistant radiolabeled bands in Fig. 1, lanes 2, 4 and 6). These telomerase positive fractions were pooled and loaded onto a Heparin HiTrap column. Fractions eluted with 60 mM - 450 mM KCl showed telomerase activity (Fig. 2A, lanes 1 to 6), which was also confirmed by RNase A and proteinase K pre-treatments (Fig. 1, lanes 2, 4 and 6, and Fig. 2B, lanes 4 and 5).

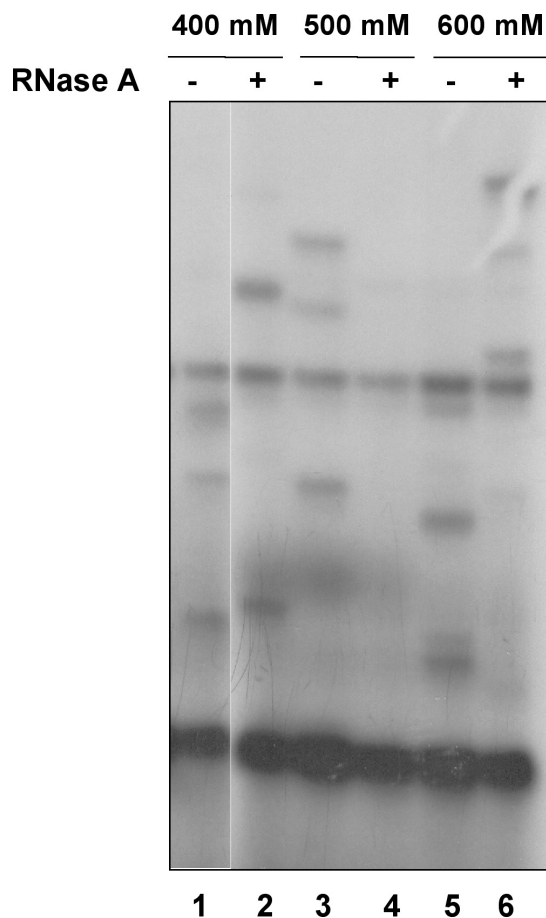


Fig. 1. Telomerase activity in total extracts of *L. amazonensis* was purified by ion exchange chromatography. DEAE Sepharose eluates were tested by Two-tube TRAP assays and were fractionated in a 10% denaturing PAGE (7 M urea) in 1 X TBE. Each sample was pre-treated with RNase A to ensure for the presence of telomerase activity. Lane 1, 400 mM eluate; lane 2, 400 mM eluate pre-treated with RNase A; lane 3, 500 mM eluate; lane 4, 500 mM eluate pre-treated with RNase A; lane 5, 600 mM eluate; lane 6, 600 mM eluate pre-treated with RNase A.

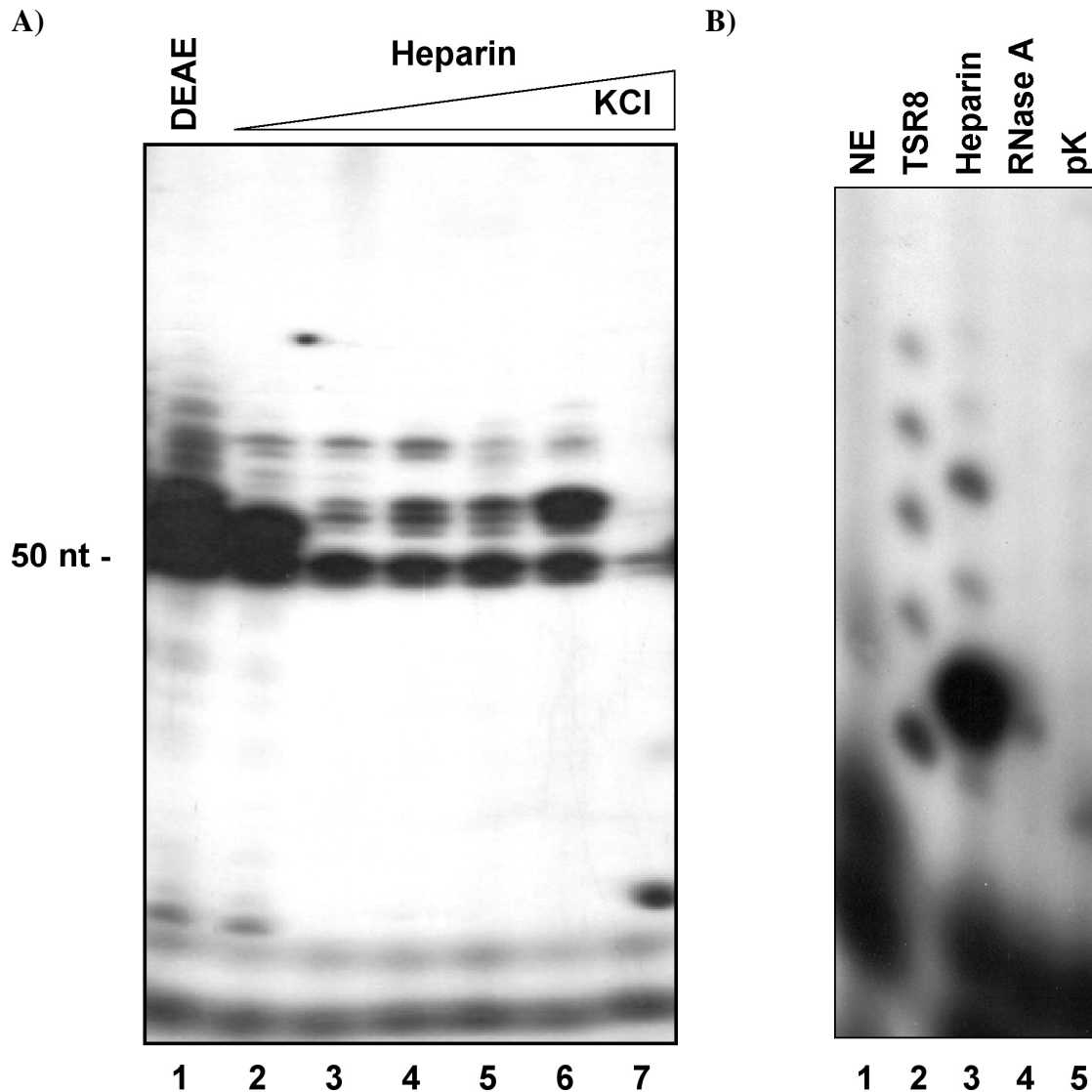


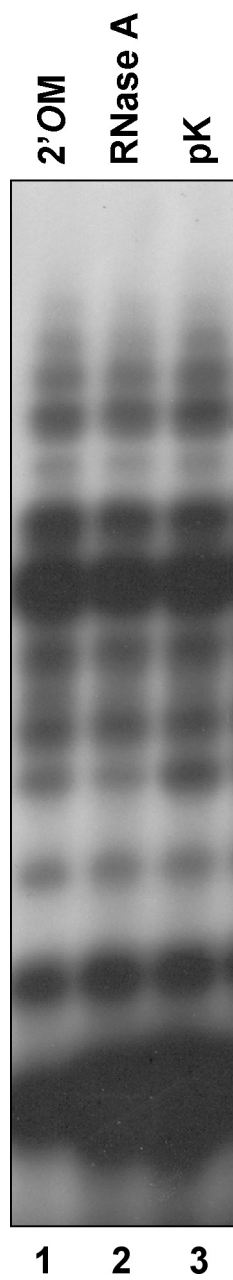
Fig. 2. Telomerase activity in extracts purified by Heparin HiTrap affinity chromatography. In A) and B), the enzyme activity was determined by Two-Tube TRAP assays and the reactions were fractionated in 10% PAGE containing 7 M urea. **A)** The positive DEAE Sepharose fractions were pooled and loaded onto a Heparin HiTrap affinity chromatography column and fractions were eluted using increasing concentrations of KCl (60 mM to 1M). Telomerase activity was detected in all fractions between 60 mM and 450 mM. Lane 1, the assay was done with the DEAE Sepharose fractions pool; lanes 2 to 6, telomerase positive fractions eluted from the Heparin HiTrap column using 60 mM to 450 mM KCl; lane 7, telomerase negative fraction eluted from the Heparin HiTrap column using 1 M KCl. The band that correspond to 50 nucleotides is shown on the left. **B)** A pool of Heparin HiTrap fractions was tested using the Two-tube TRAP assay (lane 3); the same pool sample was pre-treated with RNase A (lane 4) and proteinase K (pK, lane 5) to ensure for the presence of telomerase activity. NE, negative control reaction using no extract (lane 1). TSR8, positive control reaction using TSR8 oligonucleotide (lane 2).

Telomerase-positive Heparin fractions were pooled and loaded onto a NeutrAvidin affinity column containing a 5'-biotin-2'-*O*-methyl antisense oligoribonucleotide complementary to the trypanosome telomerase RNA template sequences (Fig. 3). To elute telomerase activity, a 2.5 X excess of a displacement oligonucleotide complementary to the entire 2'-*O*-methyl oligoribonucleotide was used without success. Contrary to all expectation, the fractions eluted from these columns contained an activity that was not sensitive either to RNase A or to proteinase K pre-treatments (Fig. 3A, lanes 1 to 3). Thus, we concluded that they can be due to PCR elongation of the displacement oligonucleotide.

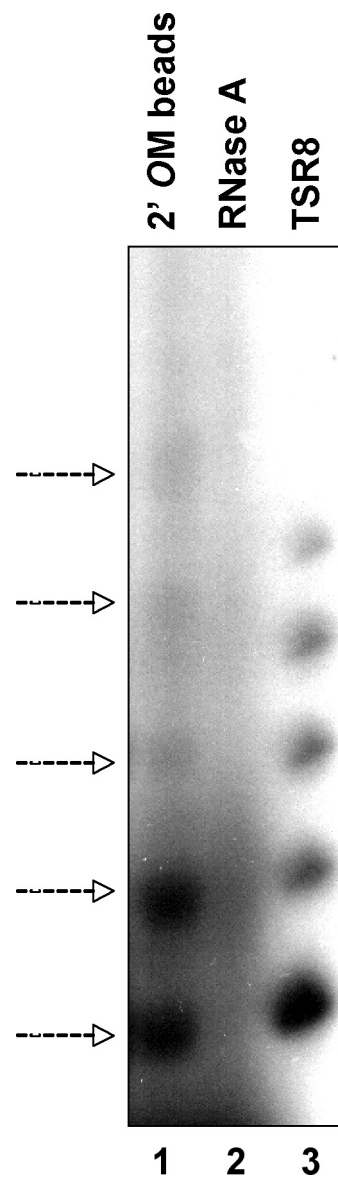
Since no telomerase activity was eluted from this column, the enzyme was probably retained into the resin. To test this hypothesis, Two-tube TRAP assays were carried out directly with the column beads. The results showed that the beads retained *Leishmania* telomerase enzyme activity confirming that *Leishmania* telomerase remains bound to the 2'-*O*-methyl oligoribonucleotide (Fig. 3B, lanes 2 and 3). This suggests that *Leishmania* telomerase seems to interact with the 2'-*O*-methyl oligoribonucleotide with such high affinity that competitive elution can not occur under the mild conditions used to retain enzyme activity. Similar results have already been shown by Muñoz and Collins (2004) during the purification of *T. cruzi* telomerase using a 2'-*O*-methyl affinity column. Conversely, human and *Euplotes* telomerases were successfully purified using the same approach (Schnapp et al., 1998, Lingner and Cech, 1996).

The telomerase-containing beads were fractionated in a Coomassie-stained SDS-PAGE confirming the presence of a bound polypeptide band of ~160 kDa as shown in Fig. 3C (lane 1). Although the amount of protein is not enough to be analyzed by mass spectrometry, we speculate that it corresponds to the *L. amazonensis* telomerase protein component. The predicted size for the polypeptide encoded by the recently cloned *L. amazonensis* TERT gene is approximately 157.5 kDa (Giardini et al., 2006).

A)



B)



C)

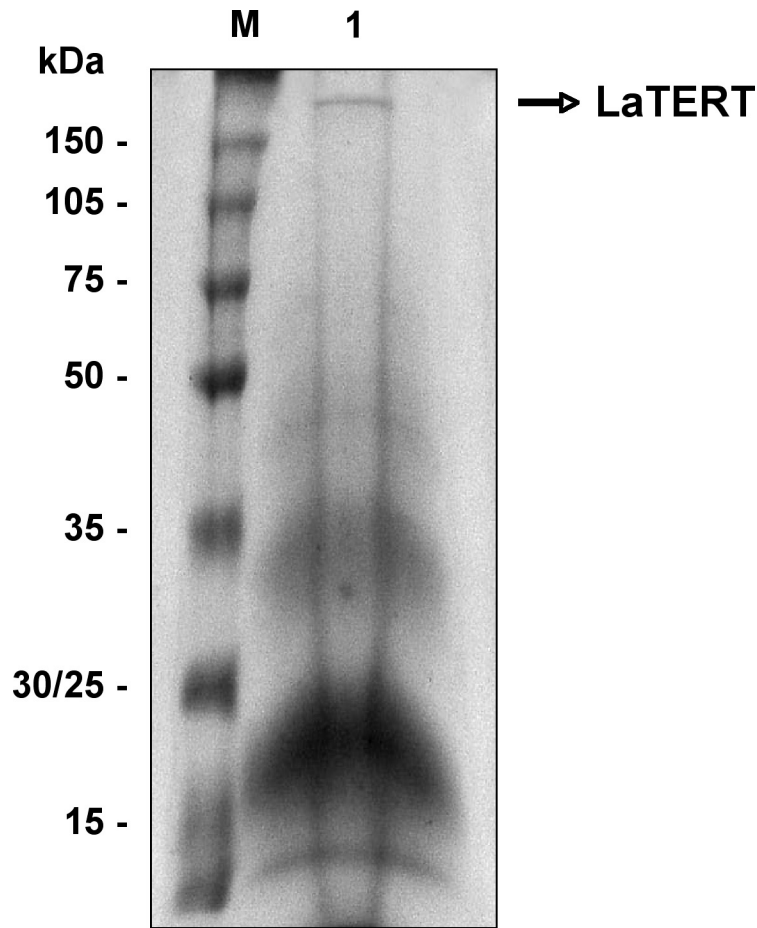


Fig. 3. Analysing *Leishmania* telomerase eluted and not eluted from a 2'*O*-methyl oligoribonucleotide. In A) and B), the reaction samples were fractionated in 10% denaturing PAGE (7 M urea). **A)** Two-Tube TRAP assays performed using the 2'*O*-methyl column fraction eluted after addition of the displacement oligo. Lane 1, telomerase ladder pattern obtained from the 2'*O*-methyl column eluate; lane 2, the same eluate was pre-treated with RNase A to show that the ladder pattern is not due to telomerase activity, lane 3, the same eluate was pre-treated with proteinase K (pK) to confirm that the ladder pattern is not due to telomerase activity. **B)** Two-Tube TRAP assays performed using the 2'*O*-methyl column resin beads. This figure shows that the *L. amazonensis* telomerase remained tightly bound to the 2'*O*-methyl column and that it is indeed sensitive to pre-treatment with RNase A. Lane 1, beads containing telomerase bound to the 2'*O*-methyl oligoribonucleotide; lane 2, a control reaction was done pre-treating the 2'*O*-methyl beads with RNase A; lane 3, a positive control reaction was done using TSR8 oligonucleotide. **C)** Coomassie-stained 10% SDS-PAGE showing a polypeptide of approximately 160 kDa eluted from beads containing telomerase activity shown in B). The beads were mixed with 1X SDS-PAGE gel loading buffer and boiled for 5 minutes before loading onto the gel. This result might corroborate the predicted size for the polypeptide encoded by the recently cloned *L. amazonensis* TERT gene (157.5 kDa, Giardini et al., 2006). M, molecular weight marker. LaTERT, predicted *L. amazonensis* TERT component.

***L. amazonensis* telomerase can be purified and eluted from a G-rich telomeric DNA affinity column (G-DNA)**

Telomerase positive fractions eluted from DEAE Sepharose were pooled and loaded onto an affinity column containing a 5'-biotin-G-DNA oligonucleotide coupled to NeutrAvidin beads (Pierce). Fractions were eluted using increasing concentrations of KCl (300 mM – 600 mM). Enzyme activity was detected in the 600 mM KCl fraction, as shown by RNase A and proteinase K pre-treatments (Fig. 4A, lanes 1-3). However, these fractions also seemed to be contaminated with DNA or other enzyme activity that co-eluted with telomerase, since some non-specific bands were visible in the proteinase K pre-treated sample (Fig. 4A, lane 3). To test this hypothesis, samples were eluted with a higher salt concentration (2 M KCl) and were submitted to RNase A and proteinase K pre-treatment or heat inactivation. As expected, an activity that resembled the telomerase ladder pattern appeared, although it was not sensitive to any of the treatments used to confirm the presence of telomerase (Fig. 4B, lanes 1 to 4). The ladder pattern was probably also due to PCR amplification of DNA contaminating samples or to the presence of other enzyme activity.

To circumvent these problems, the 500 mM and 600 mM fractions of the G-DNA column, as well as the DEAE Sepharose telomerase positive fractions, were separately pooled, concentrated and treated with RNase free-DNase I. Pools were then loaded separately onto two Superose 6 PC 3.2/30 gel filtration columns. Fractions 5-8, 9-13 and 14-16 eluted from the DEAE pooled fractions (data not shown) and 5-8 and 9-13 from the G-DNA fractions showed telomerase activity, as confirmed by RNase A pre-treatment (Fig. 4C, lanes 1 and 3, lanes 2 and 4).

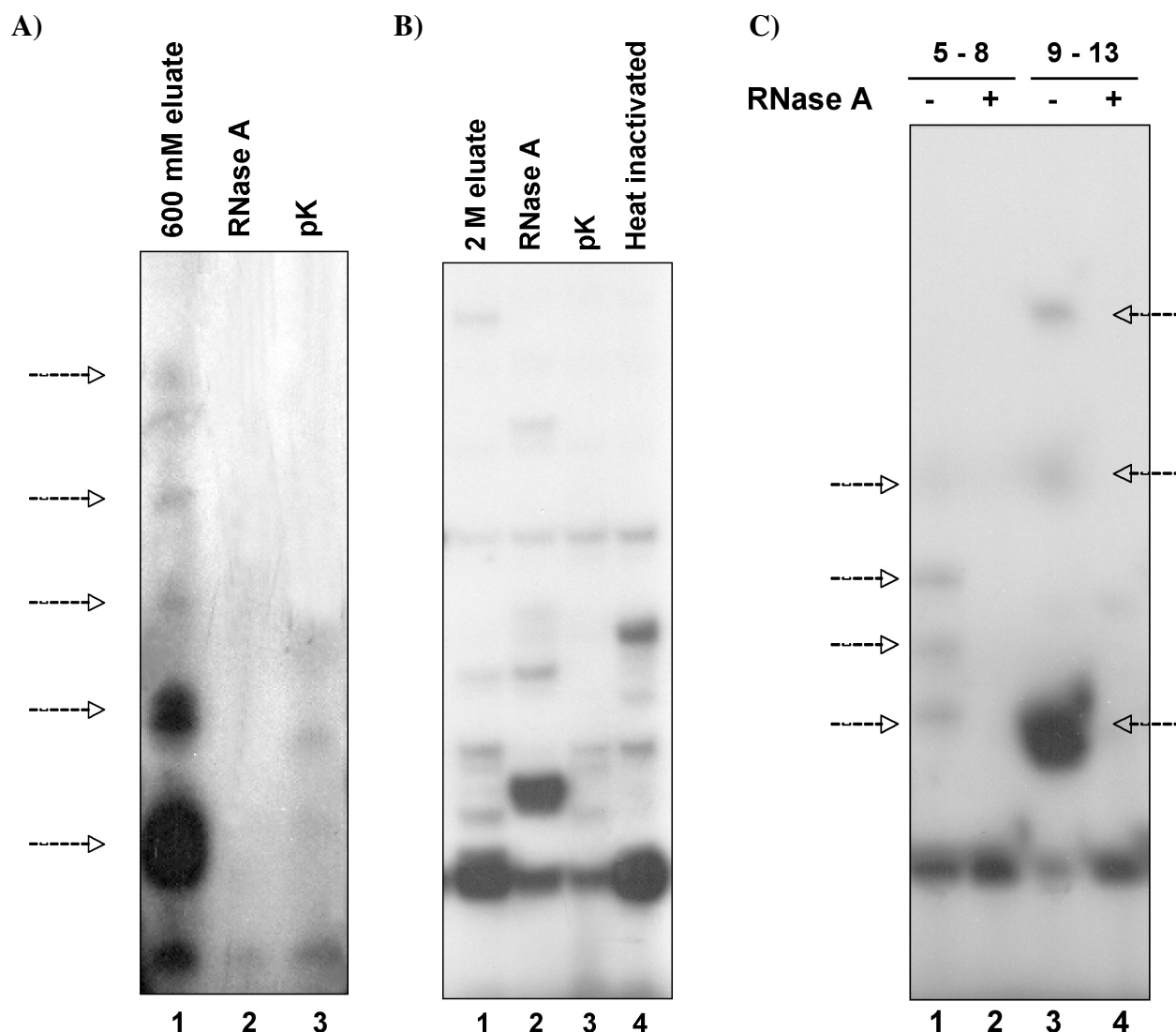


Fig. 4. *L. amazonensis* telomerase activity can be salt eluted from a G-rich telomeric affinity column. In A) and B), Two-tube TRAP assays were performed using G-DNA affinity column fractions eluted with 600 mM and 2 M KCl, respectively. **A)** Lane 1, telomerase activity eluted from the G-DNA affinity column using 600 mM KCl; lane 2, control reaction where the 600 mM KCl eluate was pre-treated with RNase A; lane 3, control reaction where the 600 mM KCl eluate was heat inactivated. **B)** Two-tube TRAP assays were done using fraction eluted with 2 M KCl to test if the telomeric DNA oligonucleotide was contaminating the G-DNA affinity column samples. Lane 1, 2 M eluate showing the typical telomerase banding pattern; lanes 2-4, the same sample was pre-treated with RNase A, pre-treated with proteinase K (pK) or heat inactivated, respectively. These results show that the G-DNA oligonucleotide is probably being eluted using these stringency conditions. **C)** Positive G-DNA fractions were pooled, pre-treated with DNase I and then separated in a Superose 6 PC 3.2/30 gel filtration column using 1X TM containing 500 mM NaCl. The gel filtration fractions were concentrated and pooled as follows: 1-4, 5-8, 9-13, 14-16 and 17-20. Telomerase activity was present in fractions 5-8 (lane 1) and 9-13 (lane 3) and it was absent when the same samples were pre-treated with RNase A (lanes 2 and 4).

Together, all these data indicate that *L. amazonensis* telomerase can be purified using a combination of ion exchange and affinity chromatographic methods, and refined by DNase I treatment followed by gel filtration. As shown in SDS-PAGE in Fig. 3C, *L. amazonensis* telomerase has a high affinity for the 2'-O-methyl oligoribonucleotide, which allowed to check for enzyme activity and to purify a candidate telomerase protein band that was bound to the beads. However, using an affinity chromatography column with a telomeric G-rich oligonucleotide as ligand (G-DNA) it was easier to elute *Leishmania* telomerase activity. In both cases, telomerase activity was contaminated either with DNA or other enzyme. This problem could easily be overcome by treating the contaminated fractions with DNase I followed by additional purification through a gel filtration column. The results presented in this article have the aim to expand our knowledge about the *Leishmania* telomerase enzyme features, which will be essential to indicate if telomerase will be a good target for the development of efficient anti-parasite drugs.

REFERENCES

- 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.
- 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.
- Blackburn, E.H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 106: 661-673.
- Blackburn, E.H. (2005). Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett.*, 579: 859-862.
- 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.
- Bryan, T.M., Goodrich, K.J., Cech, T.R. (2000). Telomerase RNA bound by protein motifs specific to telomerase reverse transcriptase. *Mol. Cell.*, 6: 493-499.
- Cano, M.I., Dungan, J., Agabian, N. & Blackburn, E.H. (1999). Telomerase in Kinetoplastid Parasitic Protozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 3616-3621.
- Chen, J.L., Greider, C.W. (2004). An emerging consensus for telomerase RNA structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 14683-14684.
- Cohn, M., Blackburn, E.H. (1995). Telomerase in yeast. *Science*, 269: 396–400.
- Dreesen, O., Li, B., Cross, G.A.M. (2005). Telomere structure and shortening in telomerase-deficient *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.*, 33: 4536–4543.
- Dudognon, C., Pendino, F., Hillion, J., Saumet, A., Lanotte, M., Segal-Bendirdjian, E. (2004). Death receptor signaling regulatory function for telomerase: hTERT abolishes TRAIL-induced apoptosis, independently of telomere maintenance. *Oncogene*, 23: 7469-7474.
- Eugster, A., Lanzaolo, C., Bonneton, M., Luciano, P., Pollice, A., Pulitzer, J.F., Stegberg, E., Berthiau, A.S., Forstemann, K., Corda, Y., Lingner, J., Geli, V., Gilson, E. (2006). The finger subdomain of yeast telomerase cooperates with Pif1p to limit telomere elongation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13: 734-739.
- Friedman, K.L., Heit, J.J., Long, D.M., Cech, T.R. (2003). N-terminal domain of yeast telomerase reverse transcriptase: recruitment of Est3p to the telomerase complex. *Mol. Biol. Cell*, 14: 1-13.
- Giardini, M.A., Lira, C.B.B., Conte, F.F., Camillo, L.R., Siqueira Neto, J.L., Ramos, C.H.I., Cano, M.I.N. (2006). The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: gene cloning and characterization. *Parasitology Res.*, 98: 447-454.
- Greider, C.W. (1998). Telomeres and senescence: the history, the experiment, the future. *Curr. Biol.*, 8: 178-181.
- Greider, C.W., Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*, 43: 405–413.
- Harley, C., Futcher, A., Greider, C. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345: 458–460.
- 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.
- Harrington, L. (2005). Making the most of a little: dosage effects in eukaryotic telomere length maintenance. *Chromosome Res.*, 13: 493-504.
- Jacobs, S.A., Podell, E.R., Cech, T.R. (2006). Crystal structure of the essential N-terminal domain of telomerase reverse transcriptase. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13: 218-225.

- Kelleher, C., Teixeira, M.T., Forstemann, K., Lingner, J. (2002). Telomerase: biochemical considerations for enzyme and substrate. *Trends. Biochem. Sci.*, 27: 572-579.
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D. et al. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 266: 2011–2015.
- Lai, C.K., Mitchell, J.R., Collins, K. (2001). RNA binding domain of telomerase reverse transcriptase. *Mol. Cell. Biol.*, 21: 990-1000.
- 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.
- Lue, N.F. (2005). A physical and functional constituent of telomerase anchor site. *J. Biol. Chem.*, 280: 26586-26591.
- Lundblad V, Szostak JW. 1989. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell*, 57: 633–643.
- Magenat, L., Tobler, H., Muller, F. (1999). Developmentally regulated telomerase activity is correlated with chromosomal healing during chromatin diminution in *Ascaris suum*. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 3457–3465.
- Masutomi, K., Kaneko, S., Hayashi, N., Yamashita, T., Shiota, Y., Kobayashi, K., Murakami, S. (2000). Telomerase activity reconstituted in vitro with purified human telomerase reverse transcriptase and human telomerase RNA component. *J. Biol. Chem.*, 275: 22568-22573.
- McKnight, T.D., Fitzgerald, M.S., Shippen, D.E. (1997). Plant telomeres and telomerases. A review. *Biochemistry (Mosc.)*, 62: 1224–1231.
- Mergny, J.L., Riou, J.F., Mailliet, P., Teulade-Fichou, M.P., Gilson, E. (2002). Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res.*, 30: 839-865.
- Miller, M.C., Collins, K. (2000). The *Tetrahymena* p80/p95 complex is required for proper telomere length maintenance and micronuclear genome stability. *Mol. Cell*, 6: 827–837.
- Moriarty, T.J., Huard, S., Dupuis, S., Autexier, C. (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.
- Morin, G.B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*, 59: 521–529.
- Muñoz, D.P., Collins, K. (2004). Biochemical properties of *Trypanosoma cruzi* telomerase. *Nucleic Acids Res.*, 32: 5214-5222.
- Pardue, M.L., DeBaryshe, P.G. (2003). Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. *Annu. Rev. Genet.*, 37: 485-511.
- Prescott, J. and Blackburn, E.H. (1997). Functionally interacting telomerase RNAs in the yeast telomerase complex. *GenesDev.*, 11: 2790–2800.
- Reddel, R.R. (2003). Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer. *Cancer Lett.*, 194: 155-162.
- Sasaki, T., Fujiwara, H. (2000). Detection and distribution patterns of telomerase activity in insects. *Eur. J. Biochem.*, 267: 3025–3031.
- 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.
- Singer, M.S., Gottschling, D.E. (1994). TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science*, 266: 404–409.
- Smith, L.L., Collier, H.A., Roberts, J.M. (2003). Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nat. Cell. Biol.*, 5: 474-479.

Smogorzewska, A., de Lange, (2004). Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 73:177-208.

Wang, L., Dean, S.R., Shippen, D.E. (2002). Oligomerization of the telomerase reverse transcriptase from *Euplotes crassus*. *Nucleic Acids Res.*, 30: 4032-4039.

Weinrich, S.L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V.M., Holt, S.E., Bodnar, A.G., Lichtsteiner, S., Kim, N.W., Trager, J.B., Taylor, R.D., Carlos, R., Andrews, W.H., Wright, W.E., Shay, J.W., Harley, C.B., Morin, G.B. (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat. Genet.*, 17: 498-502.

Xia, J., Peng, Y., Mian, I.S., Lue, N.F. (2000). Identification of functionally important domains in the N-terminal region of telomerase reverse transcriptase. *Mol. Cell. Biol.*, 20: 5196-5207.

5.1.3. Conclusões deste capítulo

- Os experimentos realizados mostraram que há atividade de telomerase nos extratos purificados de *L. amazonensis*.
- A telomerase de *L. amazonensis* pode ser purificada e enriquecida utilizando-se uma combinação de cromatografias de troca iônica e de afinidade, refinada por tratamento com DNase I e por purificação em coluna de gel filtração.
- A telomerase de *Leishmania* liga-se muito fortemente ao oligoribonucleotídeo 2'*O*-metil, não sendo eluída da resina utilizando-se as condições de eluição gentis necessárias para manter a atividade enzimática. Contudo, foram possíveis a checagem da atividade enzimática e a purificação de uma banda protéica ligada à resina.
- A forte interação com o oligoribonucleotídeo 2'*O*-metil pode ser útil para inibir a atividade da telomerase *in vivo* nestes organismos, já que este oligoribonucleotídeo liga-se à região do molde do componente TER.
- A telomerase de *L. amazonensis* pode ser purificada e eluída de forma eficiente da coluna de afinidade quando o DNA telomérico rico em G (G-DNA) foi utilizado como ligante.
- Nos dois processos de purificação (DEAE e G-DNA), parece haver a contaminação da amostra com moléculas de DNA. Para contornar este problema, as amostras eluídas foram tratadas com DNase I e a seguir foram novamente purificadas, desta vez por gel filtração.

6. CAPÍTULO III

6.1. Considerações iniciais

As ferramentas geradas e os resultados obtidos neste capítulo fazem parte de um estágio de doutorado sanduíche realizado na Universidade da Califórnia – Los Angeles (UCLA) sob a supervisão do Prof. Dr. David Campbell e da Prof^a. Dr^a. Nancy Sturm. Os objetivos iniciais deste estágio eram a purificação do complexo holoenzimático da telomerase utilizando o sistema “PTP-tagging” e a identificação do componente RNA da telomerase em tripanossomatídeos.

O sistema “PTP-tagging” é um sistema de purificação por afinidade em *tandem* que permite a purificação rápida e eficiente de complexos protéicos marcados com o epítopo PTP a partir de extratos brutos e sob condições nativas. Originalmente chamado de sistema TAP (“*tandem* affinity purification”), este método foi bem estabelecido em leveduras e também tem sido utilizado com sucesso em mamíferos [Knuesel et al, 2003], insetos [Forler et al, 2003], *E. coli* [Gully et al, 2003], plantas [Rohila et al, 2004] e tripanossomatídeos [Aphasizhev et al, 2003; Schimanski et al, 2005a, Schimanski et al, 2005b]. Com o objetivo de purificar o complexo holoenzimático da telomerase de *T. brucei*, foram geradas ferramentas para possibilitar a marcação da proteína TbTERT pelo sistema “PTP-tagging”. Decidiu-se que seria necessário anular um dos alelos do gene TbTERT primeiro e só depois marcar o outro alelo selvagem com a etiqueta PTP, pois deste modo a célula não teria outra opção senão expressar o alelo marcado, enriquecendo o extrato protéico final em proteínas marcadas. Assim, realizaram-se duas construções: a primeira responsável por substituir de modo sítio-dirigido um dos alelos do gene TbTERT, e a segunda responsável pela marcação da porção C-terminal do outro alelo selvagem do gene TbTERT com a etiqueta PTP. Essas construções foram transfectadas nos parasitas *T. brucei* e os clones transfectantes foram selecionados.

Para tentar identificar o componente RNA da telomerase de tripanossomatídeos, foram realizadas reações de sequenciamento a partir de ensaios de “primer extension”, um método utilizado para medir a quantidade de um transcrito de RNA específico ou para mapear o início da transcrição (terminal 5') de um transcrito. Estes ensaios identificaram uma sequência de DNA que pode codificar o componente TER de *T. brucei*.

6.2. GERAÇÃO DE FERRAMENTAS PARA A PURIFICAÇÃO DO COMPLEXO HOLOENZIMÁTICO DA TELOMERASE DE *Trypanosoma brucei* UTILIZANDO O SISTEMA “PTP-TAGGING”

6.2.1. Material e Métodos

6.2.1.1. Cultivo de formas procíclicas de *T. brucei*

Formas procíclicas de *T. brucei* linhagem yTAT KH4A foram cultivados a 28°C em meio Cunningham's SM [Cunningham, 1977] suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab). Culturas em fase logarítmica de crescimento (aproximadamente 5×10^6 células/ml) foram utilizadas para transfecção e a seguir cultivadas no mesmo meio, porém na presença das drogas fleomicina (2.5 µg/ml) ou G418 (40 µg/ml).

6.2.1.2. Clonagem das regiões 5' e 3' não traduzidas (UTR) do gene TbTERT no vetor pKO-Fleo

A estratégia para a clonagem baseou-se na amplificação por PCR de fragmentos correspondentes às regiões 5'UTR (5' não traduzida) e 3'UTR (3' não traduzida) que flanqueiam o gene TERT em *T. brucei*. Essas sequências foram encontradas no banco de dados público de *T. brucei* (GeneDB, www.genedb.org/genedb/trypl/). Foram então desenhados oligonucleotídeos iniciadores a partir dessas seqüências (5'-UTR-TbTERT-HindIII-F= 5' – AAA GCT TAC ACG AGT ATA ACA TTG C – 3'; 5'-UTR-TbTERT-EcoRI-R = 5' – TGA ATT CCA TTT GTG CCA TGT AGT C – 3'; 3'-UTR-TbTERT-XbaI-F = 5' – ATC TAG ATC TGC ATG AAA TGC AAG C – 3'; 3'-UTR-TbTERT-NotI-R = 5' – TGC GGC CGC TGA CTT ATT GTC ATG – 3'). Para nocautear um dos alelos do gene TERT de *T. brucei* (TbTERT), utilizou-se um método denominado ruptura direcionada de gene. Nesse método, seqüências complementares as regiões 5'UTR e 3'UTR de um determinado gene são inseridas em um vetor chamado pKO-Fleo. Para a construção deste vetor, um fragmento *EcoRI/XbaI* de 2410 pb do vetor pXS2 [Bangs et al., 1996] contendo no sentido 5'-3': 1) região intergênica da prociclina EP1-EP2, 2) gene marcador que confere resistência ao antibiótico fleomicina (Fleo), 3) região intergênica da tubulina β/α , foi clonado nos sítios correspondentes do vetor pBluescript IISK- (pBSIISK-, Stratagene, San Diego, CA, EUA) (ver diagrama representando este cassete na Figura 24). Construções

específicas para anular o gene TbTERT foram montadas primeiramente com a inserção de um fragmento *HindIII/EcoRI* de 669 pb da porção 5'UTR do gene TbTERT nos sítios correspondentes na porção à montante do sítio de poli-clonagem do vetor pKO-Fleo. Um segundo fragmento de 485 pb foi então amplificado a partir da região 3'UTR do gene TbTERT e inserido à jusante do sítio de poli-clonagem do mesmo vetor (Figura 24B). A digestão dessas construções com as enzimas *ClaI* e *SacI* liberou um fragmento linear contendo o marcador seletivo da fleomicina flanqueado pelas seqüências 5'UTR e 3'UTR homólogas às encontradas no cromossomo selvagem para que ocorra a completa substituição de um dos alelos do gene TbTERT pelo gene que codifica o marcador de resistência (Fleo) via recombinação homóloga. Na Figura 24C, encontra-se um diagrama mostrando como foi realizada esta substituição gênica.

6.2.1.3. Clonagem de um fragmento do gene TbTERT no vetor pC-PTP-Neo

pC-PTP-Neo é um vetor de integração no genoma de *T. brucei* derivado do vetor pBluescript SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA) contendo uma etiqueta PTP e o marcador de resistência à droga G418 (Figura 26). Em pC-PTP-Neo, o cassete PTP contém 745 pb de uma região que codifica o C-terminal da proteína TbU1-70K, um sítio de restrição de *NotI*, a seqüência que codifica a etiqueta de PTP, o códon de terminação de tradução TGA, e 470 pb da região adjacente 3' de TbRPA1, o gene que codifica a maior subunidade da RNA polimerase I. O cassete do marcador de resistência contém o gene da neomicina fosfotransferase (NEOr), que confere resistência ao antibiótico G418, flanqueado 5' pelas regiões intergênicas da proteína de choque térmico 70 ("heat shock protein 70", HSP70) genes 2 e 3 e flanqueado 3' pelas regiões intergênicas dos genes da β - e α - tubulina. A construção pC-PTP-Neo-TbTERT é derivada do vetor pC-PTP-Neo, sendo que a região C-terminal do gene TbTERT compreendendo os últimos 3122 nucleotídeos foi inserida na região precedente à seqüência PTP. Para a amplificação dessa seqüência, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores senso Tb-PTPtag-ApaI-F = 5' – TGG GCC CCC CTC TGA AGC G – 3' e antisenso Tb-PTPtag-NotI-R = 5' – TGC GGC CGC TGC AGA GCG – 3'. Para que ocorresse a integração genômica, a construção pC-PTP-Neo-TbTERT foi linearizada com a enzima *XmaI*, a qual apresentava um único sítio de restrição aproximadamente no meio da seqüência TbTERT clonada. Após a linearização, a construção passou a apresentar duas regiões homólogas ao gene TbTERT selvagem em suas extremidades (Figura 26C).

Também foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para tentar amplificar e clonar a região C-terminal do gene TERT de *L. tarentolae* (LtTERT), mas essa amplificação não foi possível. Contudo, conseguiu-se amplificar o fragmento correspondente do gene de *L. amazonensis* (LaTERT) e clonar este fragmento no vetor pC-PTP-Neo. O protocolo foi o mesmo utilizado para a clonagem do gene TbTERT, exceto que neste caso foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores senso Lt-PTPtag-MfeI-F = 5'- TCA ATT GTC TGC TCA CCC GC - 3' e antisenso Lt-PTPtag-NotI-R = 5'- TGC GGC CGC AGT CTG CGA G - 3' e a construção será linearizada com a enzima *AvaI*. Não se sabe se este vetor será capaz de se integrar no genoma de *Leishmania*, já que ele é um vetor de integração para ser utilizado em *T. brucei*. Porém é válido testar esta técnica também em *Leishmania*, nem que seja preciso otimizar o vetor para este organismo.

6.2.1.4. Transfecção de formas procíclicas de *T. brucei* com as construções TbTERT-5'-3'-pKO-Fleo e pC-PTP-Neo-TbTERT

Formas procíclicas de *T. brucei* tipo selvagem, clone yTAT KH4A, foram eletroporadas com 5 µg da construção TbTERT-5'-3'-pKO-Fleo linearizada com as enzimas *ClaI/SacI* usando um protocolo padrão [Bangs et al, 1996]. Resumidamente, cerca de 5×10^6 células/ml foram homogeneizados em 450 µl de meio de eletroporação (90 mM KCl, 0,1125 mM CaCl_2 , 9.25 mM K_2HPO_4 , 18.75 mM Hepes, 1.5 mM EDTA, 4 mM MgCl_2 , 69.25 mM sacarose), misturados a 100 µl de cada construção de DNA linearizada (5 µg) e colocados em cubetas de eletroporação de 4 mm (Bio-rad). Amostras sem a presença de DNA também foram eletroporadas como controle ("mock"). As eletroporações foram realizadas utilizando-se o aparelho Bio-Rad Gene Pulser II, com dois pulsos de 1500 V, 25 µF, com intervalo de 10 segundos entre os pulsos. Permitiu-se que as células transfectadas se recuperassem por 24 horas e o meio Cunningham's SM contendo 10% de soro fetal bovino foi então suplementado com 2.5 µg/ml de fleomicina. As células resistentes a fleomicina cresceram após aproximadamente 11 dias de seleção com a droga, sendo então submetidas à diluição clonal para que fossem selecionados os clones.

Os clones resistentes à fleomicina, ou seja, aqueles que perderam um dos alelos do gene TbTERT por recombinação e adquiriram o gene Fleo, foram então eletroporados com 5 µg da construção pC-PTP-Neo-TbTERT linearizada com a enzima *XmaI*. Amostras controles foram eletroporadas na ausência de DNA. O protocolo de eletroporação foi o mesmo descrito acima.

Deve-se lembrar que em todos os passos desta segunda transfecção, as células permaneceram sempre em meio Cunningham's SM contendo 10% de soro fetal bovino suplementado com 2.5 µg/ml de fleomicina. Permitiu-se que as células transfectadas se recuperassem por 24 horas, adicionando-se a seguir 40 µg/ml da droga G418. As células resistentes à fleomicina e à G418 (apresentando um dos alelos anulado e o outro fusionado com a etiqueta PTP) cresceram após aproximadamente 16 dias de seleção com ambas as drogas. O próximo passo foi verificar a correta integração da construção TbTERT-5'-3'-pKO-Fleo por PCR, sendo que posteriormente será necessário realizar análise por "Southern blotting". Para verificar a expressão das proteínas fusionadas com a etiqueta PTP, serão realizados ensaios de "Western blotting" utilizando o anticorpo HPC4 anti-ProtC.

6.2.1.5. Análise por PCR da correta integração do cassete contendo o gene Fleo no locus do gene TbTERT

Para checar se a integração do cassete contendo o gene Fleo ocorreu no local correto, utilizou-se primeiramente uma análise por PCR. Espera-se que se a integração ocorrer corretamente em um dos alelos, o gene TbTERT é substituído pelo cassete contendo o gene da fleomicina por recombinação homóloga. Para a análise por PCR, amplificou-se um fragmento específico que só seria gerado caso ocorresse a correta integração. Foram utilizados então um oligonucleotídeo iniciador senso complementar a região 5'UTR nativa do cromossomo (5'-UTR-TbTERT-HindIII-F = 5' – AAA GCT TAC ACG AGT ATA ACA TTG C – 3') e um oligonucleotídeo iniciador antisenso complementar ao gene da fleomicina (Fleo_BamHI_R = 5' – TGG ATC CTC AGT CCT GCT C – 3'), o qual foi integrado juntamente com o cassete. O produto gerado tem 1999 pb e corresponde exatamente ao tamanho esperado do fragmento compreendido entre a região 5'UTR nativa do gene TbTERT e o gene da fleomicina que foi inserido durante a recombinação homóloga.

6.2.2. Resultados obtidos

6.2.2.1. Substituição de um dos alelos do gene TbTERT nativo

Para substituir um dos alelos do gene TbTERT pelo cassete contendo o gene da fleomicina, as regiões não traduzidas 5'UTR e 3'UTR adjacentes ao gene TERT nativo de *T.*

brucei foram amplificadas por PCR (Figura 24A, linhas 1 e 3, respectivamente) e clonadas no plasmídeo pKO-Fleo. Além das regiões 5'UTR e 3'UTR, este plasmídeo continha o gene que confere resistência ao antibiótico fleomicina e as regiões intergênicas necessárias para a expressão deste gene (Figura 24B). O plasmídeo foi linearizado e transfectado em parasitas *T. brucei* procíclicos em fase logarítmica de crescimento. Dentro dos parasitas, o plasmídeo sofreu recombinação homóloga com as regiões 5'UTR e 3'UTR nativas do gene TbTERT, o qual foi inteiramente substituído pelo cassete contendo o gene de resistência à fleomicina (ver esquema da substituição na Figura 24C).

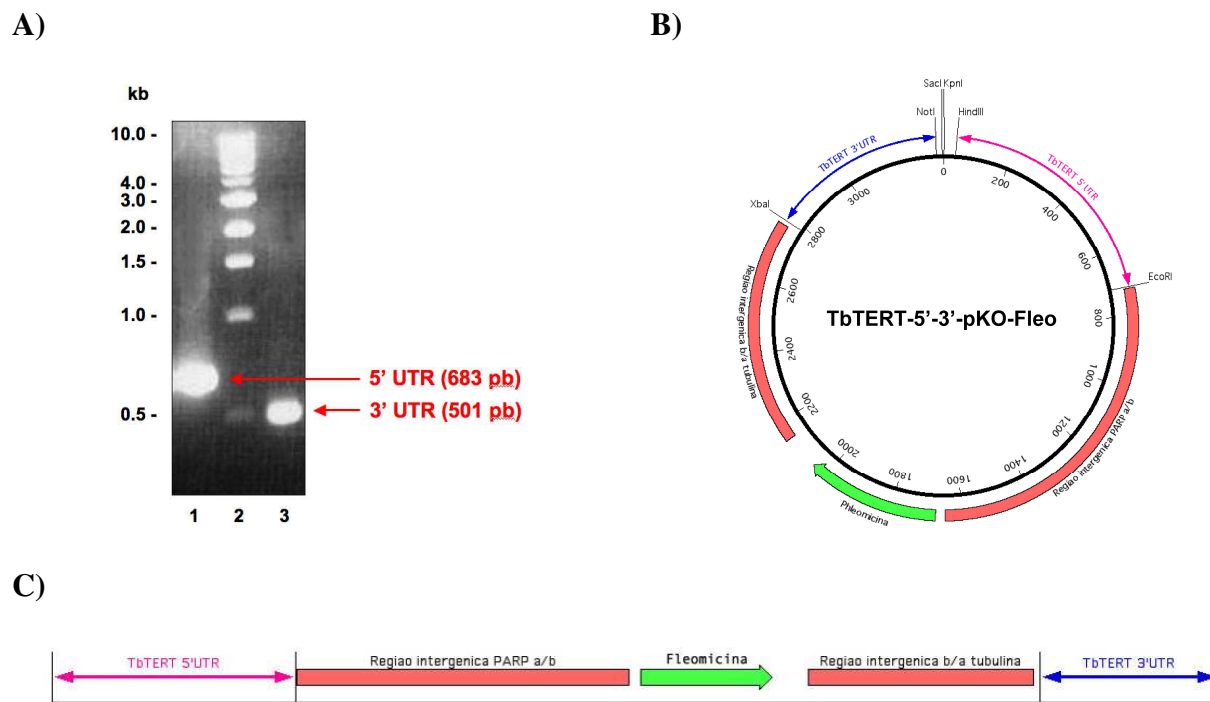


Figura 24 – Substituição de um alelo do gene TbTERT. **A)** Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, mostrando a amplificação por PCR das regiões 5'UTR (683 pb, linha 1) e 3'UTR (501 pb, linha 3) adjacentes ao gene TERT de *T. brucei*. Linha 2, marcador de peso molecular de 1 kb. **B)** Mapa circular (em escala) da construção TbTERT-5'-3'-pKO-Fleo, responsável por anular um dos alelos do gene TERT em *T. brucei*. O plasmídeo contém o cassete do marcador de resistência à droga fleomicina (seqüência codificadora em verde). As regiões 5'UTR e 3'UTR adjacentes ao gene TbTERT encontram-se, respectivamente, em rosa e azul. As regiões flangeadoras que fornecem os sinais de processamento de RNA para o marcador de resistência são as regiões intergênicas da prociclina (PARP) e da α/β tubulina, ambas na cor salmão. **C)** Ilustração do *locus* do gene TbTERT em um dos alelos após a substituição do gene selvagem pelo cassete contendo o gene da fleomicina. As cores são como descritas em **B)**, e o diagrama não está em escala.

A clonagem da região 5'UTR foi possível sem grandes problemas, porém, a clonagem da região 3'UTR foi dificultada pela presença de um sítio de restrição da enzima *XbaI* que estava sendo metilado pela maquinaria celular das bactérias DH5 α (metilação DAM). Após a minipreparação, o fragmento 3'UTR não estava sendo excisado do plasmídeo de clonagem pCR[®] 2.1, já que o sítio de restrição apresentava-se metilado e não estava sendo reconhecido pela enzima *XbaI*. Para finalmente excisar o fragmento 3'UTR do plasmídeo de clonagem, utilizou-se o sítio de restrição da enzima *NotI*, presente em uma das extremidades do fragmento 3'UTR, e o sítio da enzima *EcoRV*, presente no plasmídeo pCR[®] 2.1, no lugar do sítio da enzima *XbaI*. A enzima *EcoRV* cortou o DNA gerando extremidades abruptas. Enquanto isso, o plasmídeo pKO-Fleo foi primeiramente digerido com *XbaI*, e então teve suas extremidades coesivas preenchidas pela adição de nucleotídeos (utilizando-se o fragmento *Klenow* da enzima DNA polimerase I), tornando as extremidades abruptas. A seguir, esse plasmídeo foi digerido com a enzima *NotI* (a outra enzima utilizada para a excisar o fragmento), permanecendo com uma extremidade abrupta gerada pelo preenchimento da simples-fita com nucleotídeos e a outra extremidade coesiva gerada pela enzima *NotI*. Esta estratégia permitiu a rápida excisão e a clonagem do fragmento 3'UTR no plasmídeo pKO-Fleo, possibilitando a transfecção dos parasitas *T. brucei* com esta construção e a conseqüente substituição de um dos alelos do gene TbTERT por recombinação homóloga.

6.2.2.2. Análise parcial da integração correta do cassete contendo o gene da fleomicina no locus gênico de TbTERT

Para checar a correta integração da construção TbTERT-5'-3'-pKO-Fleo e a conseqüente substituição de um dos alelos do gene TERT de *T. brucei*, realizou-se a amplificação por PCR de um fragmento específico que só seria gerado no caso da correta integração no locus gênico de TbTERT. Para checar a integração específica, amplificou-se um fragmento de 1999 pb a partir do DNA genômico extraído dos parasitas transfectados com a construção TbTERT-5'-3'-pKO-Fleo, utilizando-se um oligonucleotídeo senso complementar a região 5'UTR que flanqueia o gene TbTERT e um oligonucleotídeo antisense complementar à porção C-terminal do gene que confere resistência ao antibiótico fleomicina. A amplificação deste fragmento por PCR pode ser conferida na Figura 25, tanto a partir de parasitas transfectados originados da população heterogênea inicial (linhas 8 e 9), quanto de clones de parasitas gerados somente após a diluição

clonal (linhas 4 a 7). Esta análise por PCR nos permitiu verificar que a construção TbTERT-5'-3'-pKO-Fleo integrou-se corretamente no *locus* gênico de TbTERT. Porém, este tipo de análise não pode mostrar se a integração não ocorreu também em outros locais no genoma do parasita. Para descartar esta hipótese, será realizado um experimento de “Southern blotting” utilizando como sonda o gene que confere resistência ao antibiótico fleomicina. Estes experimentos em conjunto nos permitirão confirmar a correta integração do cassete da fleomicina no genoma do parasita.

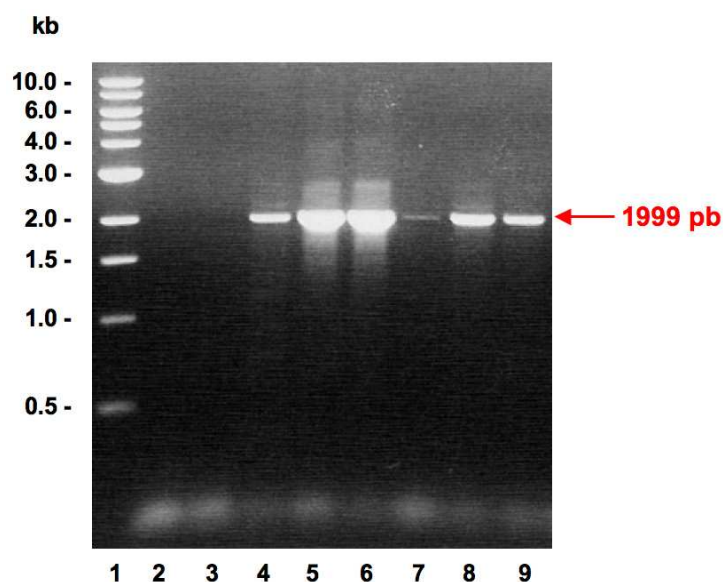


Figura 25 – Análise da integração da construção TbTERT-5'-3'-pKO-Fleo no genoma de *T. brucei*. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, mostrando a amplificação por PCR de um fragmento específico que indica a integração de forma correta. A amplificação foi realizada utilizando-se um oligonucleotídeo senso complementar à região 5'UTR do gene TbTERT e um oligonucleotídeo antisense complementar ao gene marcador de resistência à fleomicina (vide Figura 24C), gerando um fragmento de 1999 pb (linhas 4 a 9). Linha 1, marcador de peso molecular de 1 kb; linha 2, controle negativo da reação de PCR onde não houve a adição de DNA; linha 3, controle negativo da amplificação, onde foi utilizado como substrato o DNA genômico de parasitas selvagens que não tinham sofrido a integração do gene da fleomicina. Linhas 4 a 7, produto amplificado a partir de clones de parasitas gerados após a diluição clonal; linhas 8 e 9, produto amplificado a partir de parasitas transfectados originados da população heterogênea inicial.

6.2.2.3. Marcação do outro alelo TbTERT nativo com a etiqueta PTP

Para marcar o segundo alelo do gene TbTERT com a etiqueta PTP, a região C-terminal do gene TbTERT nativo, contendo os últimos 3122 nucleotídeos, foi amplificada por PCR (Figura 26A, linha 2). Este fragmento foi clonado no plasmídeo pC-PTP-Neo, o qual continha o gene que confere resistência ao antibiótico G418 (Figura 26B). A construção pC-PTP-Neo-TbTERT foi linearizada e transfectada em parasitas *T. brucei* em fase logarítmica de crescimento que já apresentavam um dos alelos do gene TbTERT anulado. Uma vez no interior desses parasitas, o plasmídeo sofreu recombinação homóloga com a região do gene TbTERT que havia sido clonada, inserindo após o gene nativo o cassete contendo a etiqueta PTP, o gene de resistência a G418 e as regiões intergênicas responsáveis pela expressão deste gene (ver esquema Figura 26C).

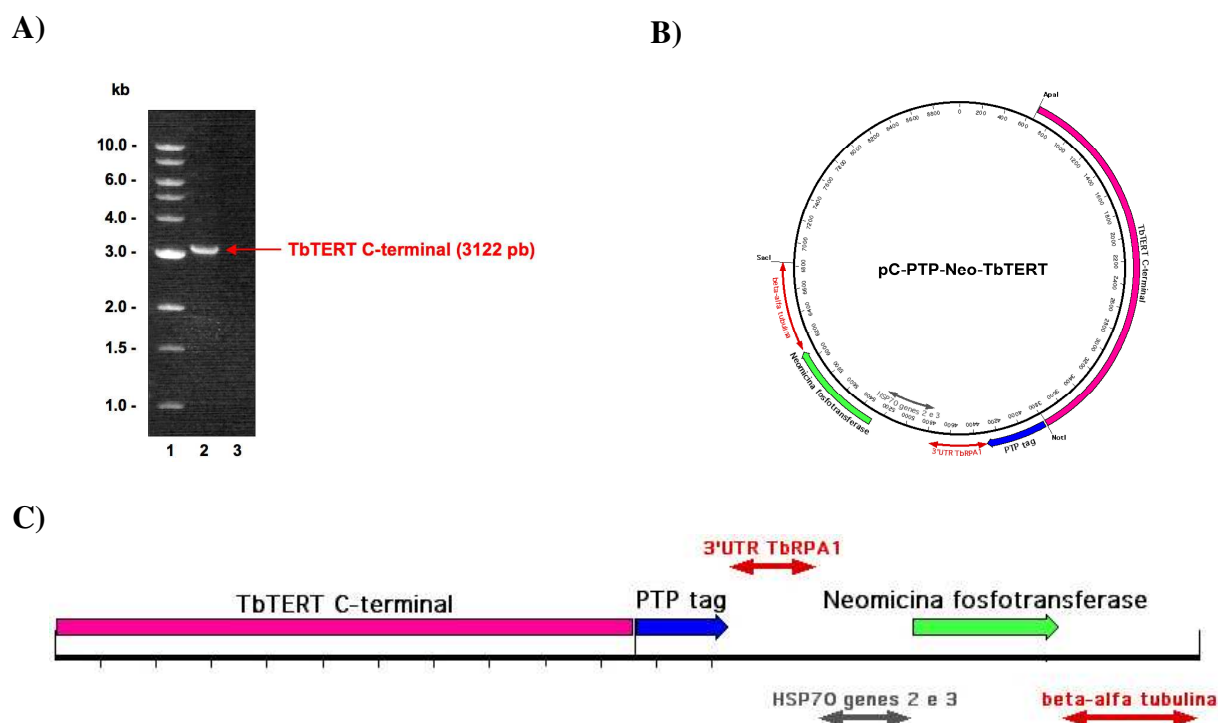


Figura 26 - Marcação do segundo alelo do gene TbTERT com a etiqueta PTP. **A)** Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, mostrando o fragmento amplificado por PCR que contém os últimos 3122 nucleotídeos da sequência do gene TERT de *T. brucei* (região C-terminal) (linha 2). Linha 1, marcador de peso molecular de 1 kb; linha 3, controle negativo da reação de PCR realizado sem DNA. **B)** Mapa do plasmídeo pC-PTP-Neo-TbTERT (em escala) utilizado para a integração genômica. O plasmídeo contém a sequência da etiqueta PTP que será integrada na região 3' do gene alvo (TbTERT) e o cassete do marcador de resistência a G418. As sequências codificadoras da etiqueta PTP, das regiões flangeadoras do gene de *T. brucei*, e do marcador de resistência (gene da neomicina) estão coloridos em azul, vermelho/cinza e verde, respectivamente. O fragmento C-terminal do gene TbTERT encontra-se em rosa. As regiões flangeadoras que fornecem os sinais de processamento de RNA para a etiqueta PTP e para o marcador de resistência são: 3'UTR de *TbRPA1*, região intergênica dos genes 2 e 3 da *HSP70*, região intergênica da α - β tubulina, e 5'UTR de *TbRPA2*. **C)** Ilustração do gene TbTERT marcado com a etiqueta PTP. As cores são como descritas em **B)**, e o diagrama não está em escala.

Na tentativa de utilizar o mesmo sistema “PTP-tagging” para marcar o alelo do gene TERT em *L. amazonensis*, a região C-terminal do gene LaTERT nativo, contendo os últimos 1841 nucleotídeos, foi amplificada por PCR (Figura 27A, linha 2), purificada em gel e clonada no plasmídeo pC-PTP-Neo contendo o gene que confere resistência ao antibiótico G418 (Figura 27B). Este sistema ainda está em construção e serão feitos testes para se saber se haverá a

expressão do gene que confere resistência ao antibiótico G418 em *Leishmania*, já que este gene está clonado no plasmídeo pC-PTP-Neo sob controle das regiões intergênicas de genes de *T. brucei* (Figura 27B).

A purificação do complexo protéico da telomerase de *T. brucei* e de *L. amazonensis* permitirá a identificação de todas as proteínas que formam o complexo enzimático da telomerase nesses organismos, incluindo o RNA da telomerase. A identificação desses componentes poderá auxiliar futuramente no entendimento do processo de regulação da telomerase pelos seus parceiros protéicos em tripanossomatídeos.

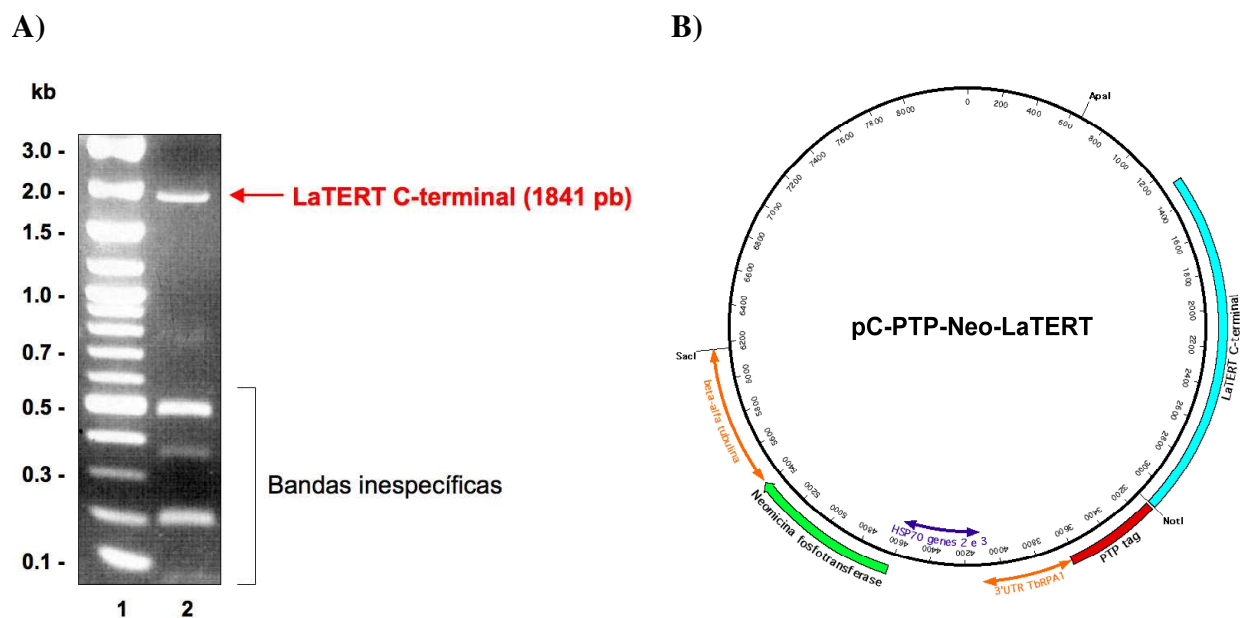


Figura 27 - Marcação do gene LaTERT com a etiqueta PTP. A) Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, mostrando o fragmento amplificado por PCR que contém os últimos 1841 nucleotídeos da sequência do gene TERT de *L. amazonensis* (região C-terminal) (linha 2). Devido à presença de bandas inespecíficas, o fragmento LaTERT C-terminal foi primeiro purificado em gel e só depois clonado no plasmídeo pC-PTP-Neo. Linha 1, marcador de peso molecular de 1 kb. B) Mapa circular (em escala) da construção de integração genômica pC-PTP-Neo-LaTERT. As partes integrantes do plasmídeo são as mesmas já descritas na Figura 26B. O fragmento C-terminal do gene LaTERT encontra-se em azul claro.

6.3. TENTATIVA DE IDENTIFICAÇÃO DO RNA DA TELOMERASE DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

6.3.1 Material e Métodos

6.3.1.1. Ensaios de “primer extension” e de seqüenciamento

Foi isolado RNA total de *T. brucei* e de *L. tarentolae* utilizando-se o reagente TRIzol (Invitrogen) segundo as recomendações do fabricante. Os ensaios de “primer extension” foram realizados utilizando-se os oligonucleotídeos pEXTel (5' – TTAGGG – 3') (dados não mostrados) e pEXTel1 (5' – GGGTTAGGG – 3'). Esses oligonucleotídeos foram previamente marcados em sua porção 5' com ^{32}P γ -ATP utilizando-se a enzima T4 polinucleotídeo quinase (T4 PNK) e purificados em colunas G-25 (GE Healthcare).

A 5 μg de RNA total foram adicionados 2 pmol do oligonucleotídeo marcado e 10 mM de cada dNTP, incubando-se a seguir por 5 minutos a 65°C. Adicionou-se ainda 1 X tampão da primeira fita, 0,01 M DTT e 200 U da transcriptase reversa SuperScript II RT (Invitrogen), incubando-se as amostras por 50 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C) ou a 40°C. Após o período de elongação, as amostras foram inativadas por 15 minutos a 70°C, homogeneizadas em 1 X tampão de amostra e fervidas por 5 minutos. As amostras foram analisadas em géis de seqüenciamento contendo 8 M uréia e 6% poliacrilamida.

Para os ensaios de “primer extension” seguidos de seqüenciamento, realizou-se o mesmo protocolo acima descrito, exceto que se fez uma reação separada para cada um dos 4 nucleotídeos. Em uma primeira reação, foram adicionados 135 μM de dideoxiadenosina (ddATP), 25 μM de deoxiadenosina (dATP) e 250 μM de cada um dos outros três nucleotídeos (TTP, dCTP e dGTP). O mesmo procedimento foi repetido individualmente para os outros nucleotídeos.

6.3.2. Resultados preliminares obtidos

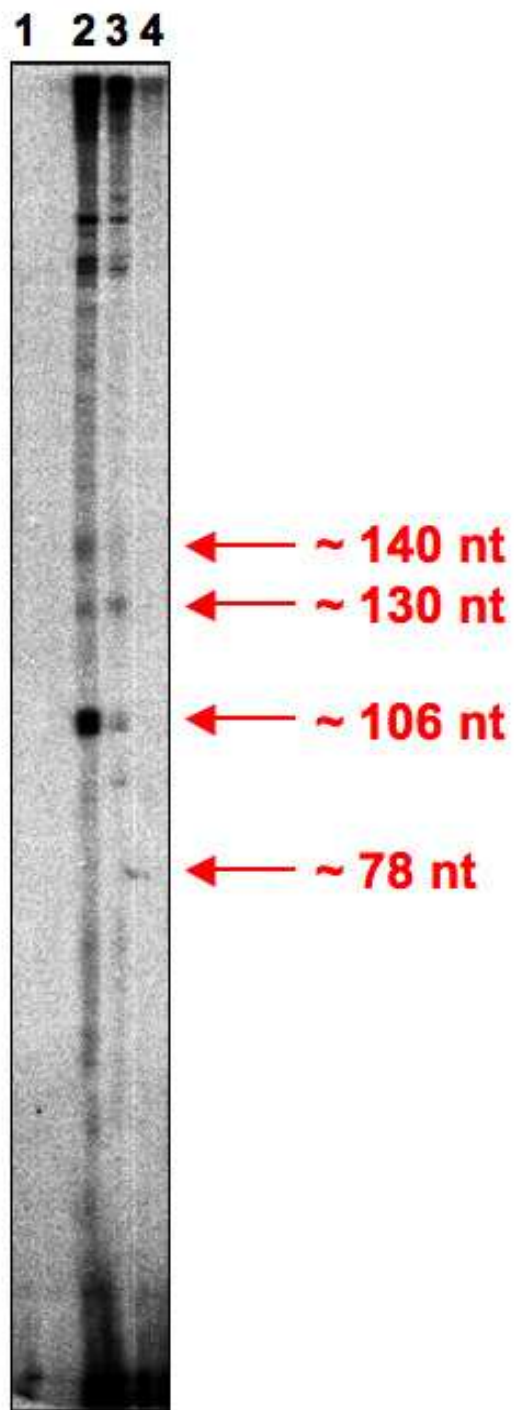
6.3.2.1. Identificação de uma sequência candidata ao gene do componente TER de *T. brucei*

Utilizou-se o ensaio de “primer extension” na tentativa de mapear a sequência existente entre o terminal 5’ e a região do molde na sequência dos RNAs da telomerase de *T. brucei* e *L. tarentolae*. Embora não sejam conhecidas características como sequência, tamanho, estrutura e especificidade dos componentes TER dos tripanossomatídeos, sabe-se que a sequência predita do molde presente no componente RNA da telomerase de *T. brucei* e de *T. cruzi* é 5’ – CCCUAACCC – 3’ [Cano et al., 1999; Muñoz e Collins, 2004]. Assim, os ensaios de “primer extension” foram realizados utilizando-se o oligonucleotídeo pEXTel1 complementar a essa sequência molde (5’ – GGGTTAGGG – 3’). Utilizou-se como substrato o RNA total extraído de parasitas das espécies *T. brucei* e *L. tarentolae* em fase exponencial de crescimento, e em duas diferentes temperaturas de anelamento e extensão. Em paralelo, foi sequenciada uma molécula de DNA aleatória, somente para facilitar a estimativa do número de nucleotídeos que foram adicionados pela enzima (dados não mostrados). O ensaio indicou que o oligonucleotídeo utilizado foi capaz de se ligar a uma molécula de RNA, provavelmente o RNA da telomerase, e de ser estendido pela transcriptase reversa, gerando moléculas de cDNA simples-fita de tamanhos variando entre ~78 e ~140 nucleotídeos de comprimento (Figura 28A, linha 3). A reação realizada a 40°C gerou menos bandas do que a reação realizada à temperatura ambiente (Figura 28A, linha 2), tornando mais fácil a análise dos resultados. O próximo passo foi tentar sequenciar o cDNA que estava sendo gerado durante as reações de “primer extension”, pois a sequência obtida poderia ser utilizada para fazer buscas por homologia no banco de dados dos projetos genomas desses parasitas. Para isso, realizaram-se reações de “primer extension” separadamente para cada um dos quatro nucleotídeos. Nessas reações, foram adicionados dideoxinucleotídeos, que são responsáveis por impedir a adição de novos nucleotídeos na molécula em que foram incorporados já que não são capazes de fazer ligações do tipo fosfodiéster com o próximo nucleotídeo, sendo chamados de terminadores de cadeia. O sequenciamento dos produtos de cDNA gerados a partir do ensaio inicial de “primer extension” possibilitou a leitura de aproximadamente 52 bases da molécula gerada a partir de *T. brucei* quando o experimento foi realizado a 40°C (Figura 28B, terceiro quadro da esquerda para a

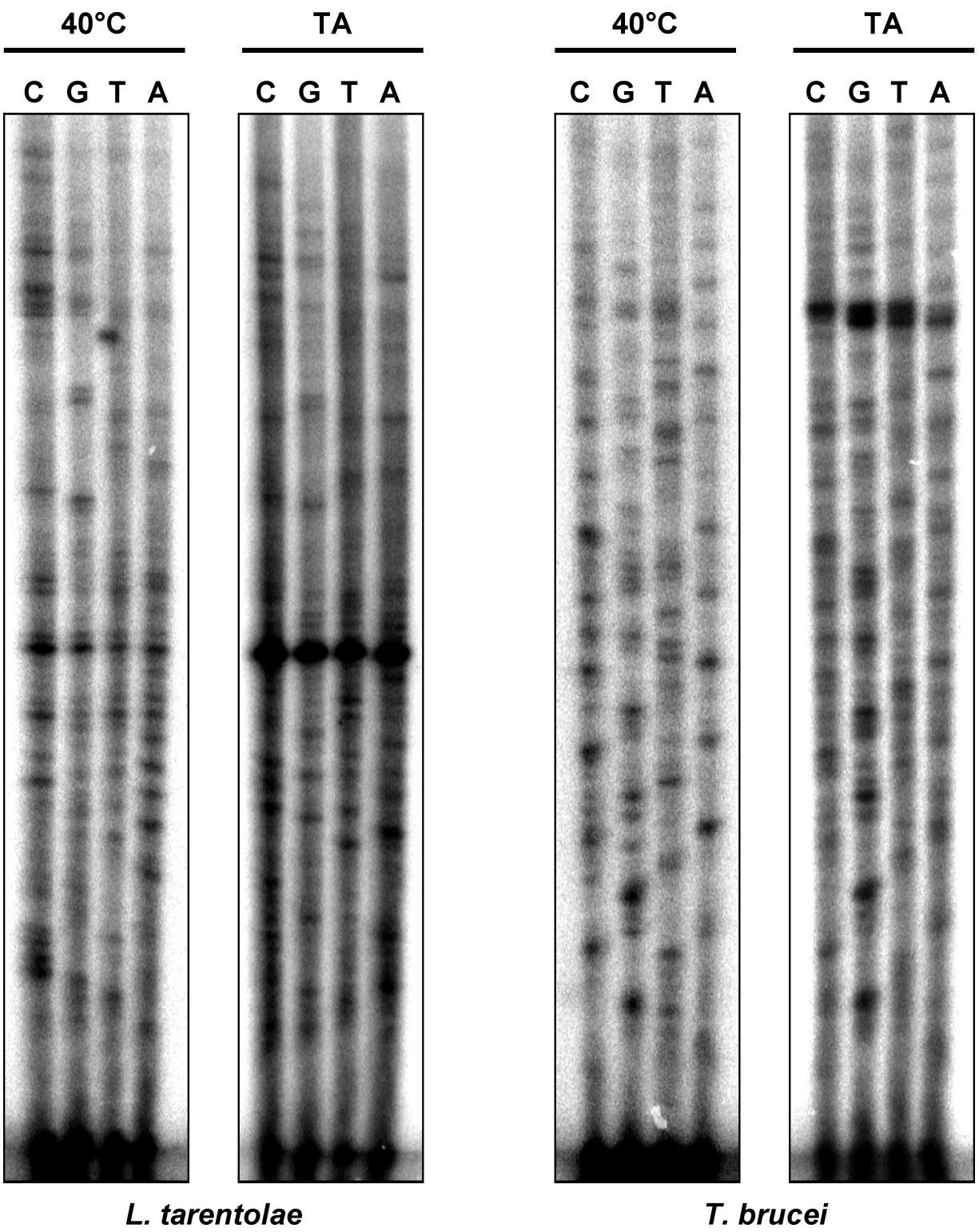
direita). O processo de leitura apresentou-se bastante dificultado devido a presença de múltiplas bandas co-migrantes. A sequência de *L. tarentolae* gerou muitos produtos em ambas as temperaturas, impossibilitando a leitura. Não se sabe se a sequência predita do molde do RNA da telomerase de *Leishmania* é a mesma encontrada em *Trypanosoma*, e portanto talvez sejam necessários outros testes utilizando diferentes oligonucleotídeos.

A sequência obtida a partir do cDNA de *T. brucei* foi comparada com as sequências presentes no banco de dados do parasita, e uma única sequência foi encontrada (T927_telo32Ae10.p1k) (Figura 28C). Esta sequência apresentou uma região que poderia corresponder ao molde do RNA da telomerase (em amarelo) e uma região que apresentou 69% de identidade com a sequência resultante do experimento (em lilás). Contudo, não parece corresponder à sequência correta, já que a distância entre a sequência lida (em lilás) e o putativo molde do RNA (em amarelo) não corresponde à distância encontrada entre os produtos estendidos e o oligonucleotídeo utilizado no experimento. Além disso, não foi encontrada nenhuma homologia entre essa sequência e as sequências dos RNAs das telomerases já descritas em outros organismos. A análise da estrutura secundária originada por essa sequência poderia ser crucial para a identificação de um candidato a RNA da telomerase. Isso porque a estrutura em forma de “pseudoknot”, encontrada na região 5’ da maioria dos componentes TER já descritos, é altamente conservada, e a sua presença, juntamente com outras características importantes dessas moléculas, sugeriria fortemente a descoberta do RNA da telomerase. Infelizmente, não foi encontrado nenhum programa computacional de análise da estrutura secundária da sequência obtida capaz de prever estruturas na forma de “pseudoknot”.

A)



B)



C)

```
>T927_telo32Ae10.plk bases 38 to 925 (SL to QR)
CGCTCAGCACCACCGCGACCTGAACATCCTGATGACCACCGAGCGCACCAGCTCCCTGAGTTACGCCGGCGTA
CGGGAAAACCTGGTGCTAACCCTGGACCAGGTCACACTCAACAGCTGGAACGAGGTGATGGTCAGCCGCTACG
ACGGCCCCACGCGCTGCTCGACTGCCTGCGGGATTACCTGAACCAGCTGCCGGCCAATCACCTGCCGCGATT
GCGGGTGCGTTGCTTCTGCCACAACCGTGCGCAATTCATTGCCAGCGCGTGGAAGAAATCTTCGACACCGCG
CAAAACCTGATGCTGAGCCAGGAAAACACCGCTACCTGGTGCAGGTGCAGCAGCACTACCACGTGATGGAAC
TGACACCCGGCCAAGCCAACCATGTGTCACTGGCGACCCAGGACGCGCTGATCGCCTACCTCAGTGAAGAACT
GGCCAGCTACAGCCCGCTGCACCTGGACACCATGGCCCTCGAAGACCACGACCTGGCGCTGTTGCTGCCCATG
GGCCTGCCCCGACTGTGTGCAGGTGTTCTACCGGATCAACGAAGGGTTGCCGAGCTGTACGTGCTGGATGAAT
TCAACGCGCTCTGGCAGCAGCGCCTGCCGTTTCACGACGAGCAAAGTCTTCTGGTGCCGCTGCAGCGCTTCCT
GCAATCGATTATTTATCGGCGCGACGCGCTGCTGCCGCTGGACCCGCAACAGCCACTCGGCGCGGTGCAAATC
CTGTATTACAGCTGTTGCCGTCAGGCAGCGGCCGCGCACGCCGGGCCGAACCGCGCCAGCGCCGCAAACCC
CGGCCAATAAACCGTTCTACGACGTGCAGGCGATTATCGGCAAGGCAGCACCCGGGCCAGGTGGGGATCACCT
TGTA CTGCAATC
```

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	Score	P (N)	N
T927_telo32Ae10.plk bases 38 to 925 (SL to QR)	97	0.95	1

```
>T927_telo32Ae10.plk bases 38 to 925 (SL to QR)
[Full Sequence] 2
```

Length = 888

Plus Strand HSPs:

Score = 97 (20.6 bits), Expect = 3.0, P = 0.95
 Identities = 37/53 (69%), Positives = 37/53 (69%), Strand = Plus / Plus
[\[HSP Sequence\]](#)

```
Query:      1 TTGTGCTCGAGGCTGCAGCGCTTCATGGCATCCATTGCTCA--GGTGC-ACGC 50
              || || | | ||||| || || || | | || || ||
Sbjct:    633 TTCTGGT-GCCGCTGCAGCGCTTCCTGCAATCGATTATTTATCGGCGCGACGC 684
```

Figura 28 – Análise de uma sequência candidata ao gene TbTER. A) Produtos de extensão do ensaio de “primer extension” gerados a partir de RNA total extraído de *T. brucei*, na presença do oligonucleotídeo pEXTel1 marcado com $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ e da transcriptase reversa. As etapas de anelamento e de extensão do oligonucleotídeo foram realizadas à temperatura ambiente (linha 2), a 40°C (linha 3) ou a 50°C (linha 4). Na linha 1, encontra-se o oligonucleotídeo pEXTel1 sozinho para servir de controle negativo da reação e de marcador de peso molecular (9 nucleotídeos). Para determinar o tamanho das moléculas estendidas, os produtos do “primer extension” foram separados por eletroforese em paralelo a uma reação de sequenciamento de DNA (dados não mostrados). O resultado mostra que foram estendidas moléculas de tamanhos entre 78 e 140 nucleotídeos, aproximadamente. B) Produtos estendidos no ensaio de sequenciamento por “primer extension”. As reações de “primer extension” foram realizadas como descritas em A), porém fazendo-se uma reação separada para cada um dos quatro nucleotídeos, utilizando-se o método de terminação por dideoxinucleotídeos (as letras C, G, T e

A no topo dos painéis indicam os dideoxynucleotídeos ddCTP, ddGTP, ddTTP e ddATP, respectivamente, utilizados em cada linha). As reações foram realizadas com RNA total de *L. tarentolae* (primeiro e segundo painéis à esquerda) ou de *T. brucei* (terceiro e quarto painéis). Testaram-se ainda reações realizadas a 40°C (primeiro e terceiro painéis, da esquerda para a direita) e à temperatura ambiente (segundo e quarto painéis). C) Sequência de nucleotídeos candidata ao gene do RNA da telomerase de *T. brucei*. No topo, encontra-se a sequência de nucleotídeos. Embaixo, encontram-se as análises realizadas pelo servidor omniBLAST [http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/t_brucei/omni].

7. CAPÍTULO IV

7.1. AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DE PROTEÍNA HOMÓLOGA À PinX1 EM *L. amazonensis*

7.1.1. Considerações iniciais

Com o intuito de encontrar proteínas que interagem com a telomerase em *Leishmania*, foram realizadas buscas no banco de dados público do Projeto Genoma *Leishmania* procurando por seqüências que compartilhassem similaridades com a proteína PinX1 de humanos. Essa busca resultou na descoberta de seqüências similares em três espécies de *Leishmania* (*L. major*, *L. infatum* e *L. braziliensis*). A tradução virtual da seqüência proveniente do genoma de *L. major* apresentou uma fase de leitura aberta de 230 aminoácidos. Uma estratégia de clonagem baseada em PCR foi utilizada para a obtenção do fragmento gênico completo da putativa proteína PinX1 de *L. amazonensis*.

7.1.2. Material e Métodos

7.1.2.1. Identificação de seqüência de *Leishmania* similar à hPinX1 e desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

As seqüências de *Leishmania major* depositadas no banco de dados do Projeto Genoma (www.ebi.ac.uk/parasites/leish.html) foram vasculhadas através do servidor omniBLAST, utilizando-se como isca a seqüência da proteína PinX1 de humanos (hPinX1p, número de acesso do GenBank AAK31790). A partir da seqüência de *L. major* obtida, foram desenhados os oligonucleotídeos senso LaPinX1_pET_F (5'- CATATGAGCACAGATCCGAATGG -3') e antisenso LaPinX1_pET_R (5'- AAGCCTCTAGGCAAGGAACGGCG -3') (as seqüências sublinhadas correspondem aos sítios de *Nde*I e *Hind*III, respectivamente).

7.1.2.2. Amplificação e clonagem da putativa PinX1 de *L. amazonensis* a partir de DNA genômico

Cerca de 200 ng de DNA genômico total foram utilizados para amplificar o putativo gene LaPinX1 através de PCR. O produto foi clonado no vetor pCR[®]2.1 (Invitrogen) para

multiplicação. A construção contendo o fragmento LaPinX1 e o vetor pET-28a(+) foram digeridos separadamente utilizando-se as enzimas *Nde*I e *Hind*III, e a seguir foram ligados pela enzima T4 DNA ligase (Invitrogen).

7.1.3. Resultados e Discussão

Estamos reportando a descoberta de uma sequência de aminoácidos que apresentou alta homologia com a PinX1 de humanos, uma proteína já descrita como inibidor natural da atividade de telomerase [Zhou e Lu, 2001, Lin e Blackburn, 2004]. O banco de dados público do Projeto Genoma *Leishmania* foi vasculhado e os resultados retornaram seqüências homólogas em *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*. A seqüência de *L. major* foi encontrada no “contig1” do cromossomo 6 e apresentava 693 pb de comprimento (Figura 29A), originando uma seqüência de 230 aminoácidos (Figura 29B). Análises comparativas entre as seqüências de aminoácidos da PinX1 de humanos (hPinX1) e de *L. major* (LmPinX1) por BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) e por ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/) mostraram que essas seqüências compartilham 25% de identidade e 43% de similaridade (Figura 29C e dados não mostrados).

Após a obtenção dessa seqüência nucleotídica de *L. major*, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores específicos para a amplificação do gene em *L. amazonensis*. A amplificação por PCR dessa seqüência homóloga está mostrada na Figura 30, onde se encontra um gel de agarose corado com brometo de etídeo contendo o putativo gene LaPinX1 amplificado (linha 1).

A obtenção da proteína LaPinX1 recombinante seria extremamente útil para a produção de anticorpos específicos e, conseqüentemente, para a realização de ensaios funcionais em conjunto com a telomerase.

A) Sequência de nucleotídeos encontrada no banco de dados do Projeto Genoma *Leishmania* (693 pb)

ATGAGCACAGATCCGAATGGCACTCGCTGGTCAAACCTCCGAGAAGAACTTCGGCAAGGCGCTGCTGAAGAAGTCGGGGT
 GGACAGAGGGCACCGGCCTCGGCAAGGAGCAGGATGGCGTCGTCAATCACATCAAGGTGACCCGCAAGGATGGCGTGAT
 GGGGCTTGGCTATCAGGCTGGGGTGCAGGAGACGTGGACGACGACGTCAGTCACTCGGCTTCGCCGACGTCCTCACACGCATT
 AAGGCGTCTACTACCGCCGCCATCAGCGATTGAGACGACGACGCGTGGAGGCGTCGCCGTCGTCTCGCCGACGACCAACG
 GGGAGGCGAAGAAGATCGGCATGAGCCGCCACTACAAGATGTACGCCAGACGCAACGCCCTGAAGACGGAGCTCATCCA
 CGGTGGCGGCAGCGCCGAAACGGAGGTGAAGCGGTTGGAGATTCTCGGCAGCGCGGCGATGAAGCGTCGGCGCGACGCG
 GACAGCGGCGAGGATAACGACGGAGCGGGTCAGAATTGCAGCCAGCACACGTCCTCCGCCTCCACGCTCAAATCGCCAC
 TGCTGCTTCGGCTTATGGCGCGCAGCACCAAGGACGAGCCGAAGCCGACGGCGGGAGACATGACACCGGAGCAGCTCAT
 CACCATAACGAAGCCGCATCCGCGGCCTCCAAAATGCACGGATACGCCGTTTCCTTGCC**TAG**

B) Sequência de aminoácidos da proteína hipotética de *L. major* (nº acesso do GenBank CAJ02149)

MSTDPNGTRWSNSEKNFGKALLKKSQWTEGTGLGKEQDGVVNHKIVTRKDGVMGLGYQAGVQETWTTQSLGFADVLTRI
 KASTTAAISDSDDDGEASPSSTTNGEAKKIGMSRHYKMYARRNALKTELIHGGGSAETEVRLEILGSAAMKRRRDA
 DSGEDNDGAGQNCQSHTSSASTLKSPLLLRLMARSTKDEPKPTAGDMTPEQLITITKPHRPPKCTDTPFLA**@**

C)

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

LmPinX1      -----MSTDPNGTRWSNSEKNFGKALLKKSQWTEGTGLGKEQDGVVNHKIVTR  48
hPinX1      MSMLAERRRKQKWAVDPQNTAWSNDDSKFGQRMLEKMGWSKGLGAQEQGATDHIKVQV  60
              :.***:*  ***.***:***: :*:  **:*.*.***  :*:..****

LmPinX1      KDGVMGLGYQAGVQETWTTQSLGFADVLTRIKASTTAAISDSDD-----  92
hPinX1      KNNHLGLGATINNEDNWIAHQDFNQLLAELNTCHGQETDSSDKKEKKSFSLEEKSKIS 120
              *:.. :***  .  :*:  :..  .*  :*:.....  :**.*

LmPinX1      -----DGEASPSSTTNGEAKKIGMSRH 116
hPinX1      KNRVHYMKFTKGDLSSRSKTDLCIFGKRQSKKTEGDASP-STPEENETTTSAFTIQ 179
              :*:***  *:  *  :..  :..  :

LmPinX1      YKMYARRNALKT---ELIHGGGSAETEVR-----LEILGSAAMKRRRDADSG 161
hPinX1      EYFAKRMAALKNKPQVPVPGSDISEAQVERKRGKKRNEATGKDVESYLQPKAKRHTGEGK 239
              :  *  ***.  :  *..  :*:*:~  :..  *  :*:.

LmPinX1      EDNDGAGQNCQSHTSS--ASTLKSPLLLR---LMARSTKDEPKPTAG---DMTPEQLITI 213
hPinX1      PERAEAQERVAKKKSAPAEELRGPCWDQSSKASAQDAGDHVQPPEGRDFTLKPCKRRGK 299
              :.  *  :.  :*:~  .  *:.~  :  :*:~  *  :*  :*  :*:.

LmPinX1      TKPHRPPKCTDTPFLA-----  230
hPinX1      KKLQKPVEIAEDATLEETLVKKKKKDKSK 328
              .*  :  .  *:.
  
```

Figura 29 – Sequências encontradas no banco de dados de *L. major* e alinhamento entre hPinX1 e LmPinX1 por ClustalW. A) Sequência de nucleotídeos do gene putativo que codifica a proteína PinX1 em *L. major*. B) Sequência de aminoácidos da putativa proteína PinX1 em *L. major*. C) Análise por ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) do pareamento entre as sequências de aminoácidos da putativa LmPinX com a hPinX1. "*" significa que os aminoácidos daquela coluna são idênticos; ":" significa que foram observadas substituições conservativas (de acordo com as propriedades físico-químicas dos aminoácidos); "." significa que foram observadas substituições semi-conservativas.

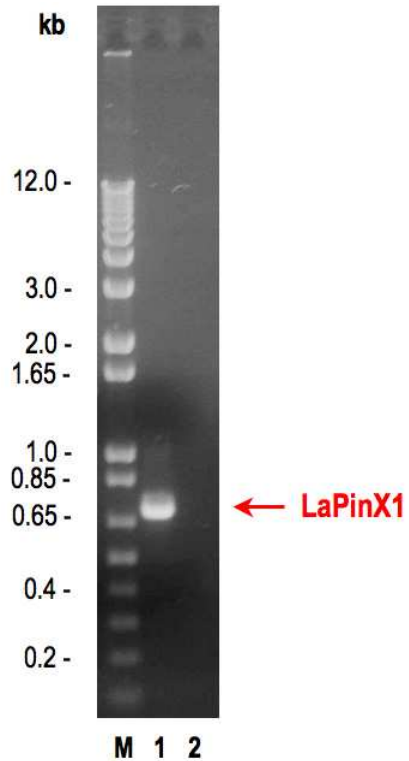


Figura 30 - Amplificação por PCR do putativo gene LaPinX1. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo contendo na linha 1 o fragmento amplificado correspondente ao gene da PinX1 em *L. amazonensis*. Na linha 2, encontra-se uma reação de controle negativo. M, marcador de peso molecular de 1 kb.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gene TERT de *L. amazonensis* foi o primeiro identificado entre todos os protozoários tripanossomatídeos [Giardini et al., 2006]. A sua identificação é que possibilitou novas buscas nos bancos de dados dos Projetos Genomas de *T. brucei* e *T. cruzi* e a descoberta dos genes homólogos nestes parasitas. Sabe-se hoje que os genes TERT de diferentes espécies de *Leishmania* apresentam alta similaridade de sequência entre si, e que eles são muito mais parecidos entre si do que com os genes dos eucariotos e até mesmo de *T. brucei* e *T. cruzi*. Além disso, as análises filogenéticas dos componentes TERT em diversos organismos distintos mostraram que a telomerase de *Leishmania* pode ser um elo de ligação entre as telomerases mais antigas e as mais recentes na história evolutiva.

A atividade enzimática da telomerase de *Leishmania*, assim como do tripanossomatídeo *T. brucei*, foi purificada pela primeira vez por Cano e colaboradores [1999]. Esta tese propõe um novo esquema de purificação da telomerase de *L. amazonensis*, desta vez utilizando-se uma combinação de cromatografias de troca iônica e de afinidade, refinadas por tratamento com DNase I para eliminar possíveis contaminantes de DNA e por uma nova purificação em coluna de gel filtração. Estes experimentos comprovaram que existe atividade de telomerase nos extratos purificados de *L. amazonensis*. Descobriu-se também que quando o oligoribonucleotídeo 2'-O-metil foi utilizado como ligante em coluna de afinidade, a atividade de telomerase de *L. amazonensis* não pode ser eluída da resina, repetindo o que já tinha sido reportado para a telomerase de *T. cruzi* [Muñoz e Collins, 2004]. Isso ocorre, provavelmente, porque as condições de eluição gentis necessárias para a manutenção da atividade enzimática não são capazes de dissociar a telomerase de *Leishmania* do oligoribonucleotídeo 2'-O-metil. Apesar disso, foi possível checar a atividade de telomerase presente na resina e purificar uma banda protéica de alto peso molecular a partir dessa mesma resina. Quando um DNA telomérico rico em G (G-DNA) foi utilizado como ligante na purificação de afinidade, a telomerase de *L. amazonensis* pôde ser purificada e eluída de forma eficiente. Mostrou-se ainda que quando ocorre contaminação das amostras com moléculas de DNA ou com outras proteínas, pode-se tratar o eluato com DNase I e purificá-lo novamente em coluna de gel filtração, e ainda assim manter a atividade enzimática no eluato final.

A construção de ferramentas para a implementação do sistema “PTP-tagging” foi de extrema importância para possibilitar a futura purificação do complexo holoenzimático da telomerase em tripanossomatídeos. Este sistema tem se apresentado bastante eficiente na purificação de pequenas quantidades de proteína a partir de extratos protéicos brutos e sob condições nativas, originando proteínas com alta atividade enzimática [Schimanski et al., 2005b]. A implementação deste sistema permitirá a identificação de todos os componentes do complexo holoenzimático da telomerase, incluindo o seu componente RNA (TER). Apesar de haver evidências da sequência do molde do RNA da telomerase em *T. brucei* e *T. cruzi* [Cano et al., 1999, Muñoz e Collins, 2004], nenhum componente TER de tripanossomatídeos foi purificado até hoje. A identificação deste componente, assim como a de outros componentes exclusivos do complexo da telomerase de *Leishmania*, poderá evidenciar novos alvos para o desenvolvimento de drogas e terapias anti-parasitárias mais eficientes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., trad. por Veiga, A.B.G. *Biologia Molecular da Célula, Artmed Editora*, 4 ed., p. 262-263.
- Amiard, S., Doudeau, M., Pinte, S., Poulet, A., Lenain, C., Faivre-Moskalenko, C., Angelov, D., Hug, N., Vindigni, A., Bouvet, P., Paoletti, J., Gilson, E., Giraud-Panis, M.J. (2007). A topological mechanism for TRF2-enhanced strand invasion. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14: 147-154.
- Aphasizhev, R., Aphasizheva, I., Nelson, R.E., Gao, G., Simpson, A.M., Kang, X., Falick, A.M., Sbicego, S., Simpson, L. (2003). Isolation of a U insertion/deletion editing complex from *Leishmania tarentolae* mitochondria. *EMBO J.*, 22: 913-924.
- Arias, J., Monteiro, P., Zicker, F. (1996). The reemerge of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emm. Infect. Dis.*, 2: 145-146.
- Armbruster B.N., Banik S.S., Guo C, Smith A.C., Counter C.M. (2001). N-terminal domains of the human telomerase catalytic subunit required for enzyme activity in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, 21: 7775-7786.
- Autexier, C., Lue, N.F. (2006). The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annu. Rev. Biochem.*, 75: 493-517.
- Baird, D.M., Farr, C.J. (2006). The organization and function of chromosomes. *EMBO Rep.*, 7: 372-376.
- Bangs, J.D., Brouch, E.M., Ransom, D.M., Roggy, J.L. (1996). A soluble secretory reporter system in *Trypanosoma brucei*. Studies on endoplasmic reticulum targeting. *J. Biol. Chem.*, 271: 18387-18393.
- Barral, A., Badaro, R., Barral-Netto, M., Grimaldi, G. Jr., Momem, H., Carvalho, E.M. (1986). Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35: 732-734.
- Barral, A., Pedral-Sampaio, D., Grimaldi Junior, G., Momen, H., McMahon-Pratt, D., Ribeiro de Jesus, A., Almeida, R., Badaro, R., Barral-Netto, M., Carvalho, E.M., et al. (1991). Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 44: 536-546.
- Barry, J.D., Ginger, M.L., Burton, P., McCulloch, R. (2003). Why are parasite contingency genes often associated with telomeres? *Int. J. Parasitol.*, 33: 29-45.
- Beattie, T.L., Zhou, W., Robinson, M.O., Harrington, L. (1998). Reconstitution of human telomerase activity *in vitro*. *Curr. Biol.*, 8: 177-180.
- Bernier, R., Turco, S.J., Olivier, M., Tremblay, M. (1995). Activation of human immunodeficiency virus type 1 in monocytoid cells by the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *J. Virol.*, 69: 7282-7285.
- Bianchi, A., Negrini, S., Shore, D. (2004). Delivery of yeast telomerase to a DNA break depends on the recruitment functions of Cdc13 and Est1. *Mol. Cell.*, 16: 139-146.
- Bittencourt, A., Barral, A., de Jesus, A.R., de Almeida, R.P., Grimaldi Junior, G. (1989). *In situ* identification of *Leishmania amazonensis* associated with diffuse cutaneous leishmaniasis in

Bahia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84: 585-586.

- Blackburn, E.H., Challoner, P.B. (1984). Identification of a telomeric DNA sequence in *Trypanosoma brucei*. *Cell*, 36: 447-457.
- Blackburn, E. H. (2001). Switching and Signaling at the Telomere. *Cell*, 106: 661-673.
- Blackburn, E.H. (2005). Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett.*, 579: 859-862.
- Blasco, M.A., Lee, H.W., Hande, M.P., Samper, E., Lansdorp, P.M., DePinho, R.A., Greider, C.W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*, 91: 25-34.
- Blasco, M.A. (2005). Mice with bad ends: mouse models for the study of telomeres and telomerase in cancer and aging. *EMBO J.*, 24: 1095-1103.
- Blasco, M.A. (2007). The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat. Rev. Genet.*, 8: 299-309.
- 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.
- Bryan, T.M., Goodrich, K.J., Cech, T.R. (2000). Telomerase RNA bound by protein motifs specific to telomerase reverse transcriptase. *Mol. Cell.*, 6: 493-499.
- 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.
- 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.
- Cano, M.I., Blake, J.J., Blackburn, E.H., Agabian, N. (2002). *Trypanosoma brucei* protein that binds G overhangs and co-purifies with telomerase activity. *J. Biol. Chem.*, 277: 896-906.
- Cano, M.I., Dungan, J., Agabian, N., Blackburn, E.H. (1999). Telomerase in Kinetoplastid Parasitic Protozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 3616-3621.
- Cano, M.I.N. (2001). Telomere biology of trypanosomatids: more questions than answers. *Trends Parasitol.*, 17: 425-429.
- Cano, M.I.N. (2006). *Ciência Hoje*, 39: 16-23.
- Chan, S.R., Blackburn, E.H. (2004). Telomeres and telomerase. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 359: 109-121.
- Chandra, A., Hughes, T.R., Nugent, C.I., Lundblad, V. (2001). Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev.*, 15: 404-414.
- Chen, J.L., Blasco, M.A., Greider, C.W. (2000). Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell*, 100: 503-514
- Chen, J.L., Greider, C.W. (2003). Determinants in mammalian telomerase RNA that mediate enzyme processivity and cross-species incompatibility. *EMBO J.*, 22: 304-314.

- Chen, J.L., Greider, C.W. (2004). An emerging consensus for telomerase RNA structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 14683-14684.
- Chen, Y., Fender, J., Legassie, J.D., Jarstfer, M.B., Bryan, T.M., Varani, G. (2006). Structure of stem-loop IV of Tetrahymena telomerase RNA. *EMBO J.*, 25: 3156-3166.
- 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.
- 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.
- Cohen, S.B., Graham, M.E., Lovrecz, G.O., Bache, N., Robinson, P.J., Reddel, R.R. (2007). Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science*, 315: 1850-1853.
- Cohn, M., Blackburn, E.H. (1995). Telomerase in yeast. *Science*, 269: 396-400.
- 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.
- Conte, F.F., Cano, M.I. (2005). Genomic organization of telomeric and subtelomeric sequences of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Int. J. Parasitol.*, 35: 1435-1443.
- Conway, C., McCulloch, R., Ginger, M.L., Robinson, N.P., Browitt, A., Barry, J.D. (2002). Ku is important for telomeres maintenance, but not for differential expression of telomeric VSG genes in African trypanosomes. *J. Biol. Chem.*, 277: 21269-21277.
- Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B., Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity, *EMBO J.*, 11: 1921-1929.
- Cristofari, G., Lingner, J. (2003). Fingering the ends: how to make new telomeres. *Cell*, 113: 552-554
- Croft, S.L., Yardley, V. (2002). Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr. Pharm. Des.*, 8: 319-342.
- Cruz, I., Nieto, J., Moreno, J., Canavate, C., Desjeux, P., Alvar, J. (2006). *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J. Med. Res.*, 123: 357-388.
- Cunningham, I. (1977). New culture medium for maintenance of tsetse tissues and growth of trypanosomatids. *J. Protozool.*, 24: 325-329.
- Dandjinou, A.T., Levesque, N., Larose, S., Lucier, J.F., Elela, S.A., Wellinger, R.J. (2004). A phylogenetically based secondary structure for the yeast telomerase RNA. *Curr. Biol.*, 14: 1148-1458.
- De Lange, T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*, 21: 532-540.
- De Lange, T. (2004). T-loops and the origin of telomeres. *Nature Reviews*, 5: 323-329.
- De Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.*, 19: 2100-2110.
- Desjeux P. (2004). Leishmaniasis. *Nat Rev Microbiol.* 2: 692.

- Dmitriev P.V., Petrov A.V., Dontsova O.A. (2003). Yeast telosome complex: components and their functions. *Biochemistry*, 68: 718-734.
- Dobson, D.E., Scholtes, L.D., Myler, P.J., Turco, S.J., Beverley, S.M. (2006). Genomic organization and expression of the expanded SCG/L/R gene family of *Leishmania major*: internal clusters and telomeric localization of SCGs mediating species-specific LPG modifications. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 146: 231-241.
- Dong, C.K., Masutomi, K., Hahn, W.C. (2005). Telomerase: regulation, function and transformation. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 54: 85-93.
- Dreesen, O., Cross, G.A. (2006a). Telomerase-independent stabilization of short telomeres in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.*, 26: 4911-4919.
- Dreesen, O., Cross, G.A. (2006b). Consequences of telomere shortening at an active VSG expression site in telomerase-deficient *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot. Cell.*, 5: 2114-2119.
- Dreesen, O., Li, B., Cross, G.A. (2007). Telomere structure and function in trypanosomes: a proposal. *Nat. Rev. Microbiol.*, 5: 70-75.
- Dreesen, O., Li, B., Cross, G.A. (2005). Telomere structure and shortening in telomerase-deficient *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.*, 33: 4536-4543.
- Dunham, M.A., Neumann, A.A., Fasching, C.L., Reddel, R.R. (2000). Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat. Genet.*, 26: 447-450.
- Eickbush, T.H. (1997). Telomerase and retrotransposons: which came first? *Science*, 277: 911-912.
- Evans, S.K., Lundblad, V. (1999). Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science*, 286: 117-120.
- Fang, G., Cech, T.R. (1993). Characterization of a G-quartet formation reaction promoted by the beta-subunit of the Oxytricha telomere-binding protein. *Biochemistry*, 32: 11646-11657.
- Fernández, M.F., Castellari, R.R., Conte, F.F., Gozzo, F.C., Sabino, A.A., Pinheiro, H., Novello, J.C., Eberlin, M.N., Cano, M.I.N. (2004). Identification of three proteins that associate *in vitro* with the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* G-rich telomeric strand. *Eur. J. Biochem.*, 271: 3050-3063.
- Figueiredo, L.M., Rocha, E.P., Mancio-Silva, L., Prevost, C., Hernandez-Verdun, D., Scherf, A. (2005). The unusually large *Plasmodium* telomerase reverse-transcriptase localizes in a discrete compartment associated with the nucleolus. *Nucleic Acids Res.*, 33: 1111-1122.
- Figueiredo, L., Scherf, A. (2005). *Plasmodium* telomeres and telomerase: the usual actors in an unusual scenario. *Chromosome Res.*, 13: 517-524.
- Folks, T.M., Clouse, K.A., Justement, J., Rabson, A., Duh, E., Kehrl, J.H. (1989). Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2365-2368.
- Forler, D., Kocher, T., Rode, M., Gentzel, M., Izaurralde, E., Wilm, M. (2003). An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. *Nat. Biotechnol.*, 21: 89-92.

- 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.
- Friedman, K.L., Heit, J.J., Long, D.M., Cech, T.R., (2003). N-terminal domain of yeast telomerase reverse transcriptase: recruitment of Est3p to the telomerase complex. *Mol. Biol. Cell.*, 14: 1-13.
- Friedman, K.L., Cech, T.R. (1999). Essential functions of amino-terminal domains in the yeast telomerase catalytic subunit revealed by selection for viable mutants. *Genes Dev.*, 13: 2863-2874.
- Froelich-Ammon, S.J., Dickinson, B.A., Bevilacqua, J.M., Schultz, S.C., Cech, T.R. (1998). Modulation of telomerase activity by telomere DNA-binding proteins in *Oxytricha*. *Genes Dev.*, 12: 1504-1514.
- Fu, G., Barker, D. (1998). Characterisation of *leishmania* telomeres reveals unusual telomeric repeats and conserved telomere-associated sequence. *Nucleic Acids Res.*, 26: 2161-2167.
- Fu, G., Melville, S.E. (2002). Polymorphism in the subtelomeric regions of chromosomes of Kinetoplastida. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 96: S31-40.
- Fu, G., Perona-Wright, G., Barker, D. (1998). *Leishmania braziliensis*: Characterisation of a complex specific subtelomeric repeat sequence and its use in the detection of parasites. *Exp. Parasitol.*, 90: 236-243.
- Giardini, M.A., Lira, C.B.B., Conte, F.F., Camillo, L.R., Siqueira Neto, J.L., Ramos, C.H.I., Cano, M.I.N. (2006). The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: gene cloning and characterization. *Parasitology Res.*, 98: 447-454.
- Gottschling, D.E., Zakian, V.A.(1986). Telomere proteins: specific recognition and protection of the natural termini of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Cell.*, 47: 195-205.
- 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.
- Greenberg, R.A., Chin, L., Femino, A., Lee, K.H., Gottlieb, G.J., Singer, R.H., Greider, C.W., DePinho, R.A. (1999). Short dysfunctional telomeres impair tumorigenesis in the INK4a(delta2/3) cancer-prone mouse. *Cell*, 97: 515-525.
- Greider, C.W., Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*, 43: 405–413.
- 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.
- 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.
- Grimaldi, G. Jr., Tesh, R.B. (1993). Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6: 230-250.
- Guglielmi, B., Werner, M.. (2002). The yeast homolog of human PinX1 is involved in rRNA and small nucleolar RNA maturation, not in telomere elongation inhibition, *J. Biol. Chem.*, 277: 35712–35719.

- Gully, D., Moinier, D., Loiseau, L., Bouveret, E. (2003). New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification. *FEBS Lett.*, 548: 90–96.
- Hammond, P.W., Lively, T.N., Cech, T.R. (1997). The anchor site of telomerase from *Euplotes aediculatus* revealed by photo-cross-linking to single- and double-stranded DNA primers. *Mol. Cell. Biol.*, 17: 296-308.
- Hardy, C.D., Schultz, C.S., Collins, K. (2001). Requirements for the dGTP-dependent repeat addition processivity of recombinant *Tetrahymena* telomerase. *J Biol Chem.*, 276: 4863-4871.
- Harrington, L. (2003). Biochemical aspects of telomerase function. *Cancer Lett.*, 194: 139-154.
- Harrington, L. (2005). Making the most of a little: dosage effects in eukaryotic telomere length maintenance. *Chromosome Res.*, 13: 493-504.
- Harrington, L., Zhou, W., Mcphail, T., Oulton, R., Yeung, D.S.K., Mar, V., Bass, M.B., Robinson, M.O. (1997). Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev.*, 11: 3109-3115.
- Heiss, N.S., Knight, S.W., Vulliamy, T.J., Klauck, S.M., Wiemann, S., Mason, P.J., Poustka, A., Dokal, I. (1998). X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat. Genet.*, 19: 32-38.
- Henderson, E. (1995). Telomere DNA structure. In: *Telomeres*, ed. Blackburn, E.H. and Greider, C.W., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 11-34.
- Henderson, E., Blackburn, E. (1993). An overhang 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol. Cell Biol.*, 9: 345-348.
- Hensen, J.D., Neumann, A.A., Yeager, T.R., Reddel, R.R. (2000). Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene*, 21: 598–610.
- Horn D., Spence C., Ingram A.K. (2000). Telomere maintenance and length regulation in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.*, 19: 2332-2339.
- Huang, H., Chopra, R., Verdine, G.L., Harrison, S.C. (1998). Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science*, 282: 1669-1675.
- Hughes, T.R., Evans, S.K., Weilbaecher, R.G., Lundblad, V. (2000). The Est3 protein is a subunit of yeast telomerase. *Curr. Biol.*, 10: 809-812.
- Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L et al. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite *Leishmania major*. *Science*, 309: 436-442.
- Jacobs, S.A., Podell, E.R., Cech, T.R., (2006). Crystal structure of the essential N-terminal domain of telomerase reverse transcriptase. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13: 218-225.
- Janzen, C.J., Lander, F., Dreesen, O, Cross, G.A., (2004). Telomeres length regulation and transcriptional silencing in KU80-deficient *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.*, 32: 6575-6584.
- Johnston, D., Blaxter, M., Degraeve, W., Foster, J., Ivens, A., Melville, S. (1999). Genomics and the biology of parasites. *BioEssays*, 21: 131-147.

- Jonsson, F., Postberg, J., Schaffitzel, C., Lipps, H.J. (2002). Organization of the macronuclear gene-sized pieces of *stichotrichous ciliates* into a higher order structure via telomere-matrix interactions. *Chromosome Res.*, 10: 445-453.
- Kelleher, C., Teixeira, M.T., Förstemann, K., Lingner, J. (2002). Telomerase: biochemical considerations for enzyme and substrate. *Trends Biochem. Sci.*, 27: 572-579.
- Keppler, B.R., Grady, A.T., Jarstfer, M.B. (2006). The biochemical role of the heat shock protein 90 chaperone complex in establishing human telomerase activity. *J. Biol. Chem.*, 281: 19840-19848.
- Kibe, T., Ono, Y., Sato, K., Ueno, M. (2007). Fission yeast Taz1 and RPA are synergistically required to prevent rapid telomere loss. *Mol. Biol. Cell.*, 18: 2378-2387.
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D. et al. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 266: 2011–2015.
- Knuesel, M., Wan, Y. Xiao, Z. Holinger, E. Lowe, N. Wang, W. Liu, X. (2003). Identification of novel protein-protein interactions using a versatile mammalian tandem affinity purification expression system. *Mol. Cell. Proteomics*, 2: 1225–1233.
- Kohlstaedt, L.A., Wang, J, Friedman, J.M., Rice, P.A., Steitz, T.A. (1992). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*, 256: 1783-1790.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lai, C.K., Miller, M.C., Collins, K. (2003). Roles for RNA in telomerase nucleotide and repeat addition processivity. *Mol Cell.*, 11: 1673-1683.
- Larson, D.D., Spangler, E.A., Blackburn, E.H. (1987). Dynamics of telomere length variation in *Tetrahymena thermophila*. *Cell*, 50: 477-483.
- Lee, S.R., Wong, J.M., Collins, K. (2003). Human telomerase reverse transcriptase motifs required for elongation of a telomeric substrate. *J. Biol. Chem.*, 278: 52531-52536.
- Lee, H.W., Blasco, M.A., Gottlieb, G.J., Horner, J.W., Greider, C.W., DePinho, R.A. (1998). Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature*, 392: 569-574.
- 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.
- Li, B., Espinal, A., Cross, G.A. (2005). *Trypanosome* telomeres are protected by a homolog of mammalian TRF2. *Mol. Cell. Biol.*, 25: 5011-5021
- Lin, J., Blackburn, E.H. (2004). Nucleolar protein PinX1p regulates telomerase by sequestering its protein catalytic subunit in an inactive complex lacking telomerase RNA. *Genes Dev*, 18: 387–396.
- Lin, J., Ly, H., Hussain, A., Abraham, M., Pearl, S., Tzfati, Y., Parslow, T.G., Blackburn, E.H. (2004). A universal telomerase RNA core structure includes structured motifs required for

binding the telomerase reverse transcriptase protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 14713-14718.

- Lingner, J., Cech, T.R., Hughes, T.R., Lundblad, V. (1997b). Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 11190-11195.

- 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.

- 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.

- Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., Cech, T.R. (1997a). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*, 276: 561-567.

- Lira, C.B., Siqueira Neto, J.L., Giardini, M.A., Winck, F.V., Ramos, C.H., Cano, M.I.N. (2007a). LaRbp38: A *Leishmania amazonensis* protein that binds nuclear and kinetoplast DNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 358: 854-860.

- Lira, C.B.B., Giardini, M.A., Siqueira Neto, J.L., Conte, F.F., Cano, M.I.N. (2007b). Telomere Biology of Trypanosomatids: beginning to answer some questions. *Trends Parasitol. In press*.

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

- Loayza, D. and de Lange, T. (2003). POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature*, 424: 926-927.

- Lue, N.F. (2004). Adding to the ends: what makes telomerase processive and how important is it? *Bioessays*, 26: 955-962.

- Lue, N.F., Lin, Y.C., Mian, I.S. (2003). A conserved telomerase motif within the catalytic domain of telomerase reverse transcriptase is specifically required for repeat addition processivity. *Mol. Cell. Biol.*, 23: 8440-8449.

- Lundblad, V., Blackburn, E.H. (1993). An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues *est1*-senescence. *Cell*, 73: 347-360.

- Lundblad, V., Szostak, J.W. (1989). A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell*, 57: 633-643.

- Lundblad, V. (2003). Telomere replication: an Est fest. *Curr. Biol.*, 13: R439-441.

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

- Makarov, V. L., Hirose, Y., Langmore, J.P. (1997). Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell*, 88: 657-666.

- Malik, H.S., Burke, W.D., Eickbush, T.H. (2000). Putative telomerase catalytic subunits from *Giardia lamblia* and *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 251: 101-108.

- Mattern, K.A., Swiggers, S.J., Nigg, A.L., Lowenberg, B., Houtsmuller, A.B., Zijlmans, J.M. (2004). Dynamics of protein binding to telomeres in living cells: implications for telomere structure and function. *Mol. Cell. Biol.*, 24: 5587-5594.
- McKnight, T.D., Fitzgerald, M.S., Shippen, D.E. (1997). Plant telomeres and telomerases. A review. *Biochemistry (Mosc.)*, 62: 1224-1231.
- Mitchell, J.R., Cheng, J., Collins, K.A. (1999a). Box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 567-576.
- Mitchell, J.R., Wood, E., Collins, K. (1999b). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*, 402: 551-555.
- Moriarty, T.J., Marie-Egyptienne, D.T., Autexier, C. (2004). Functional organization of repeat addition processivity and DNA synthesis determinants in the human telomerase multimer. *Mol. Cell. Biol.*, 24: 3720-3733.
- Morin, G.B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*, 59: 521-529.
- Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, 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.
- Muñoz, D. P., Collins, K. (2004) Biochemical properties of *Trypanosoma cruzi* telomerase. *Nucleic Acids Res.*, 32: 5214-5222.
- Muñoz-Jordán, J.L., Cross, G.A., de Lange, T., Griffith, J.D. (2001). T-loops at trypanosome telomeres. *EMBO J.*, 20: 579-588.
- Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., Saravia, N.G. (2005). Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, 366: 1561-1577.
- Murti, K.G., Prescott, D.M. (1999). Telomeres of polytene chromosomes in a ciliated protozoan terminate in duplex DNA loops. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 14436-14439.
- 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.
- Myler, P.J., Audleman, L., Devos, T., Hixson, G., Kiser, P., Lemley, C., Magness, C., Rickel, E., Sisk, E., Sunkin, S., Swartzell, S., Westlake, T., Bastien, P., Fu, P., Ivens, A., Stuart, K. (1999). *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 2902-2906.
- Nakamura, T.M., Cech, T.R. (1998). Reversing time: origin of telomerase. *Cell*, 92: 587-590.
- 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.
- Neves, D.P. (2003). *Parasitologia Dinâmica*. Ed. Atheneu, pp. 79-112.
- Neves, D.P., Melo, A.L., Genaro, O., Linardi, P.M. (2000). *Parasitologia Humana*. 10^a Edição, Ed. Atheneu, pp. 31-72.

- O'Connor, C.M., Lai, C.K., Collins, K. (2005). Two purified domains of telomerase reverse transcriptase reconstitute sequence-specific interactions with RNA. *J. Biol. Chem.*, 280: 17533-17539.
- 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.
- Ohki R, Tsurimoto T, Ishikawa F. (2001). In vitro reconstitution of the end replication problem. *Mol Cell Biol.* Sep;21(17):5753-5766.
- Olliaro, P.L., Guerin, P.J., Gerstl, S., Haaskjold, A.A., Rottingen, J-A., Sundar, S. (2005). Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980–2004. *Lancet Infect Dis*, 5: 763–774.
- Pardue, M.L., DeBaryshe, P.G. (2003). Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. *Annu. Rev. Genet.*, 37: 485-511.
- Peng Y., Mian I.S., Lue N.F. (2001) Analysis of telomerase processivity: mechanistic similarity to HIV-1 reverse transcriptase and role in telomere maintenance. *Mol Cell.* 7: 1201-1211.
- Prowse K.R., Greider C.W (1995) Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 4818-4822.
- Pryde F.E., Gorham H.C., Louis E.J. (1997). Chromosome ends: all the same under their caps. *Curr Opin Genet Dev*, 7: 822-828.
- Rabello A, Orsini M, Disch J. (2003) *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol* 97: S17-28.
- Reddel, R.R. (2003). Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer. *Cancer Lett.*, 194: 155-162.
- Reichenbach, P., Hoss, M., Azzalin, C.M., Nabholz, M., Bucher, P., Lingner, J. (2003). A human homolog of yeast Est1 associates with telomerase and uncaps chromosome ends when overexpressed. *Curr. Biol.*, 13:568-574.
- Rey, L. (2001) Parasitologia, Ed. Guanabara Koogan S.A., p.214-266.
- Riha K, Shippen DE (2003) Telomere structure, function and maintenance in Arabidopsis. *Chromosome Res.*, 11: 263-275.
- Rohila, J.S., Chen, M., Cerny, R., Fromm, M. E. (2004). Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant J.*, 38:172–181.
- Romero, D.P., Blackburn, E.H.. (1991) A conserved secondary structure for telomerase RNA. *Cell.* 67: 343-53.
- Roth C.W., Kobeski F., Walter M.F., Biessmann H. (1997) Chromosome end elongation by recombination in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Mol Cell Biol.*, 17: 5176-83.
- Salas, T.R., Petrusseva, I., Lavrik, O., Bourdoncle, A., Mergny, J.L., Favre, A., Saintome, C. (2006). Human replication protein A unfolds telomeric G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res.*, 34: 4857-4865.

- Sambrook, J., Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sampaio R.N., Salaro C.P., Resende P., De Paula C.D. (2002). American cutaneous leishmaniasis associated with HIV/ AIDS: report of four clinical cases. *Rev Soc Bras Med Trop*, 35: 651-654.
- Sasaki, T., Fujiwara, H. (2000). Detection and distribution patterns of telomerase activity in insects. *Eur. J. Biochem.*, 267: 3025–3031.
- Sbicego, S., Alfonzo, JD, Estevez, A., Rubio, M.A.T., Kang, X., Turck, C.W., Peris, M., Simpson, L. (2003). RBP38, a novel RNA-binding protein from trypanosomatid mitochondria, modulates RNA stability. *Eukaryotic Cell*, 2: 560-568.
- Schimanski B, Nguyen TN, Gunzl A. (2005a) Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*. 25: 7303-7313.
- Schimanski, B., Nguyen, T.N., Gunzl, A. (2005b). Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. *Eukaryot. Cell*, 4: 1942-1950.
- Schramke, V., Luciano, P., Brevet, V., Guillot, S., Corda, Y., Longhese, M.P., Gilson, E., Géli, V. (2004). RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends. *Nature Genetics*, 36: 46-54.
- Schraner, C., Hasse, B., Hasse, U., Baumann, D., Faeh, A., Burg, G., Grimm, F., Mathis, A., Weber, R., Günthard, H.F. (2005). Successful treatment with miltefosine of disseminated cutaneous leishmaniasis in a severely immunocompromised patient infected with HIV-1. *Clin. Infect. Dis.*, 40: e120–e124.
- Secretaria de Vigilância em Saúde. (2006). Leishmaniose visceral grave: normas e condutas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde,.
- Shay J.W., Bacchetti S. (2006). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, 33: 787–791.
- Shay J.W., Wright W.E. (2000) Implications of mapping the human telomerase gene (hTERT) as the most distal gene on chromosome 5p. *Neoplasia*. 2: 195-196.
- Shay J.W., Wright W.E. (2002) Telomerase: a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell.*, 2: 257-265.
- Shay, J.W., Wright, W.E. (2007) Hallmarks of telomeres in ageing research. *J. Pathol.*, 211: 114-123.
- Shin, J.S., Hong, A., Solomon, M.J., Lee, C.S. (2006). The role of telomeres and telomerase in the pathology of human cancer and aging. *Pathology*. 38: 103-113.
- Shippen-Lentz, D., Blackburn, E.H. (1990). Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science*, 247: 546-552.
- Simpson, L. (1987) The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol*, 41: 363-382.

- Singh, S.M., Lue, N.F. (2003). Ever shorter telomere 1 (EST1)-dependent reverse transcription by *Candida* telomerase in vitro: evidence in support of an activating function. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100: 5718-5723.
- Siqueira Neto, J.L., Lira, C.B.B., Giardini, M.A., Khater, L., Perez, A.M., Peroni, L.A., dos Reis, J.R.R., Freitas-Junior LH, Ramos CH, Cano MI. (2007) Leishmania replication protein A-1 binds in vivo single-stranded telomeric DNA. *Biochem Biophys Res Commun.*, 358: 417-423.
- Smith, J., Zou, H., Rothstein, R. (2003). Characterization of genetic interactions with RFA1: the role of RPA in DNA replication and telomere maintenance. *Biochimie.*, 82:71-78.
- Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, de Lange T. (2000). Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol.*, 20:1659-1668.
- Smogorzewska, A., de Lange, T. (2004). Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 74: 117-208.
- Snow, BE, Erdmann, N, Cruickshank, J, Goldman, H, Gill, RM, Robinson, MO, Harrington, L. (2003). Functional conservation of the telomerase protein Est1p in humans. *Curr Biol.*, 13: 698-704.
- 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. *Clin. Infect. Dis.*, 38: 1266-1272.
- 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.
- Stone, M.D., Mihalusova, M., O'connor, C.M., Prathapam, R., Collins, K., Zhuang, X. (2007). Stepwise protein-mediated RNA folding directs assembly of telomerase ribonucleoprotein. *Nature*, 446: 458-461.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, 185: 60-89.
- Teng S.C., Zakian V.A. (1999). Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19: 8083–8093.
- Tommerup, H., Dousmanis, A. & de Lange, T. (1994) Unusual chromatin in human telomeres. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5777–5785.
- Vanhamme L, Pays E, McCulloch R, Barry JD. (2001). An update on antigenic variation in African trypanosomes. *Trends Parasitol.*, 17: 338-343.
- Venkatesan R.N., Price C. (1998) Telomerase expression in chickens: constitutive activity in somatic tissues and down-regulation in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14763-14768.
- Wang, F., Podell, E.R., Zaug, A.J., Yang, Y., Baciou, P., Cech, T.R., Lei, M. (2007). The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature*, 445: 506-510.
- Weinrich, S.L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V.M., Holt, S.E., Bodnar, A.G., Lichtsteiner, S., Kim, N.W., Trager, J.B., Taylor, R.D., Carlos, R., Andrews, W.H., Wright, W.E., Shay, J.W., Harley, C.B., Morin, G.B. (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat. Genet.*, 17: 498-502.

- Wellinger, R.J., Wolf, A.J., Zakian, V.A. (1993). *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG₁₋₃ tails late in S phase. *Cell*, 72: 51-60.
- WHO. (1995). Report on the consultative meeting on *Leishmanial* HIV co-infection. *WHO/LEISH/95.35*. Geneva: World Health Organization; p. 1-4.
- Wickstead B, Ersfeld K, Gull K. (2003). Repetitive elements in genomes of parasitic protozoa. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 67: 360-375.
- Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Jauffret, Y., Dedet, J.P., Bastien, P. (1996). The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nuc. Ac. Res.*, 24: 1688-1694.
- Wirth, D. (1990). Molecular Biology of *Leishmania*. In: *Modern Parasite Biology*, ed. Wyler, D., Freeman, W. and Co., New York, pp. 348-361.
- Witkin K.L., Prathapam R., Collins K. (2007). Positive and negative regulation of Tetrahymena telomerase holoenzyme. *Mol Cell Biol.*, 27: 2074-2083.
- Witkin, K.L., Collins, K. (2004) Holoenzyme proteins required for the physiological assembly and activity of telomerase. *Genes Dev.*, 18: 1107-1118
- 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.
- Wolin, S.L., Cedervall, T. (2002). The La protein. *Annu Rev Biochem.*, 71: 375-403.
- Wright, W.E., Tesmer, V.M., Huffman, K.E., Levene, S.D., Shay, J.W. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev.*, 11: 2801-2809.
- Xia, J., Peng, Y., Mian, I.S., Lue, N.F. (2000). Identification of functionally important domains in the N-terminal region of telomerase reverse transcriptase. *Mol. Cell. Biol.*, 20: 5196-5207.
- Xin, H., Liu, D., Wan, M., Safari, A., Kim, H., Sun, W., O'Connor, M.S., Songyang, Z. (2007). TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature*, 445: 559-562.
- Zappulla D.C., Cech T.R. (2004) Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 10024–10029
- Zappulla, D.C., Goodrich, K., Cech, T.R. (2005). A miniature yeast telomerase RNA functions in vivo and reconstitutes activity in vitro. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12: 1272-1277.
- Zaug A.J., Podell E.R., Cech T.R. (2005) Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 10864-10869.
- Zhou, X.Z., Lu, K.P. (2001). The Pin2/TRF1-Interacting Protein PinX1Is a Potent Telomerase Inhibitor. *Cell*, 107: 347–359.

10. ARTIGOS EM CO-AUTORIA

10.1. ARTIGO III: Telomere biology of trypanosomatids: beginning to answer some questions. Cristina B.B. Lira, Miriam A. Giardini, Jair L. Siqueira Neto, Fábio F. Conte, Maria Isabel N. Cano (2007b). *Trends Parasitol.*, in press.

10.1.1. Resumo em inglês

Studies on the telomere structure and maintenance of trypanosomatids have provided insights into the evolutionary origin and conservation of some telomeric components shared by trypanosomes and vertebrates. For example, trypanosomatid telomeres are maintained by telomerase and comprise the canonical TTAGGG repeats, which in *Trypanosoma brucei* can form T-loops. However, the telomeric chromatin of trypanosomatids is composed by organism-specific proteins and others that share poor sequence similarity with their vertebrate counterparts. As telomere maintenance mechanisms are essential for genome stability, we propose that the particular features shown by the trypanosome telomeric chromatin harbour the key for the design of antiparasitic drugs.

10.1.2. Resumo em português

Estudos sobre a estrutura e a manutenção dos telômeros de tripanossomatídeos têm gerado informações mais acuradas sobre a origem evolucionária e a conservação de alguns dos componentes teloméricos compartilhados por tripanossomas e vertebrados. Por exemplo, os telômeros de tripanossomatídeos são mantidos pela telomerase e compreendem as repetições canônicas TTAGGG, as quais em *Trypanosoma brucei* podem formar os “T-loops”. Contudo, a cromatina telomérica dos tripanossomatídeos é composta por proteínas específicas de cada organismo e também por outras proteínas que partilham pouca similaridade de sequência com os vertebrados. Como os mecanismos de manutenção dos telômeros são essenciais para a estabilidade do genoma, nós propomos que as características particulares demonstradas pela cromatina telomérica dos tripanossomas abrigam a chave para o desenho de drogas antiparasitárias.

10.2. ARTIGO IV: *Leishmania* replication protein A-1 binds *in vivo* single-stranded telomeric DNA. Siqueira Neto, J.L., Lira, C.B.B., Giardini, M.A., Khater, L., Perez, A.M., Peroni, L.A., dos Reis, J.R.R., Freitas-Junior LH, Ramos CH, Cano MI. (2007). *Leishmania* replication protein A-1 binds *in vivo* single-stranded telomeric DNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 358: 417-423.

10.2.1. Resumo em inglês

Replication protein A (RPA) is a highly conserved heterotrimeric single-stranded DNA-binding protein involved in different events of DNA metabolism. In yeast, subunits 1 (RPA-1) and 2 (RPA-2) work also as telomerase recruiters and, in humans, the complex unfolds G-quartet structures formed by the 3' G-rich telomeric strand. In most eukaryotes, RPA-1 and RPA-2 bind DNA using multiple OB fold domains. In trypanosomatids, including *Leishmania*, RPA-1 has a canonical OB fold and a truncated RFA-1 structural domain. In *Leishmania amazonensis*, RPA-1 alone can form a complex *in vitro* with the telomeric G-rich strand. In this work, we show that LaRPA-1 is a nuclear protein that associates *in vivo* with *Leishmania* telomeres. We mapped the boundaries of the OB fold DNA-binding domain using deletion mutants. Since *Leishmania* and other trypanosomatids lack homologues of known telomere end binding proteins, our results raise questions about the function of RPA-1 in parasite telomeres.

10.2.2. Resumo em português

A proteína de replicação A (RPA) é uma proteína ligante de DNA simples-fita heterotrimérica e altamente conservada envolvida em diferentes eventos de metabolismo de DNA. Em leveduras, as subunidades 1 (RPA-1) e 2 (RPA-2) atuam também como recrutadores da telomerase e, em humanos, o complexo desenovela as estruturas de G-quadruplex formadas pela fita telomérica 3' rica em G. Na maioria dos eucariotos, RPA-1 e RPA-2 se ligam ao DNA utilizando múltiplos domínios do tipo “OB fold”. Em tripanossomatídeos, incluindo *Leishmania*, a RPA-1 apresenta um domínio “OB fold” canônico e um domínio estrutural truncado RFA-1. Em *Leishmania amazonensis*, a RPA-1 sozinha pode formar um complexo *in vitro* com a fita telomérica rica em G. Neste trabalho, nós mostramos que a LaRPA-1 é uma proteína nuclear que se associa *in vivo* com os telômeros de *Leishmania*. Nós mapeamos os limites do domínio de ligação ao DNA “OB fold” utilizando mutantes de deleção. Já que *Leishmania* e outros

tripanosomatídeos não apresentam homólogos conhecidos de proteínas ligantes de terminais teloméricos, nossos resultados levantam questões sobre a função de RPA-1 nos telômeros de parasitas.

10.3. ARTIGO V: LaRbp38: a *Leishmania amazonensis* protein that binds nuclear and kinetoplast DNAs. Lira, C.B.B., Siqueira Neto, J.L., Giardini, M.A., Winck, F.V., Ramos, C.H.I, Cano, M.I. (2007a). LaRbp38: A *Leishmania amazonensis* protein that binds nuclear and kinetoplast DNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 358:854-860.

10.3.1. Resumo em inglês

Leishmania amazonensis causes a wide spectrum of leishmaniasis. There are no vaccines or adequate treatment for leishmaniasis, therefore there is considerable interest in the identification of new targets for anti-leishmania drugs. The central role of telomere-binding proteins in cell maintenance makes these proteins potential targets for new drugs. In this work, we used a combination of purification chromatographies to screen *L. amazonensis* proteins for molecules capable of binding double-stranded telomeric DNA. This approach resulted in the purification of a 38 kDa polypeptide that was identified by mass spectrometry as Rbp38, a trypanosomatid protein previously shown to stabilize mitochondrial RNA and to associate with nuclear and kinetoplast DNA. Western blotting and supershift assays confirmed the identity of the protein as LaRbp38. Competition and chromatin immunoprecipitation assays confirmed that LaRbp38 interacted with kinetoplast and nuclear DNA *in vivo* and suggested that LaRbp38 may have dual cellular localization and more than one function.

10.3.2. Resumo em português

Leishmania amazonensis causa um amplo espectro de leishmanioses. Não há vacinas ou tratamento adequado para as leishmanioses, embora haja um interesse considerável na identificação de novos alvos para drogas anti-leishmania. O papel central das proteínas ligantes de telômeros na manutenção celular faz dessas proteínas alvos em potencial para o desenvolvimento de novas drogas. Neste trabalho, nós utilizamos uma combinação de purificações por cromatografia para examinar as proteínas de *L. amazonensis* no intuito de encontrar moléculas capazes de se ligar ao DNA telomérico dupla-fita. Esta iniciativa resultou na

purificação de um polipeptídeo de 38 kDa identificado por espectrometria de massa como sendo Rbp38, uma proteína de tripanossomatídeos que tinha sido mostrada previamente estabilizando RNA mitocondrial e se associando com DNAs do núcleo e do cinetoplasto. Ensaios de “Western blotting” e de “supershift” confirmaram a identidade da proteína como sendo LaRbp38. Ensaios de competição e de imunoprecipitação de cromatina confirmaram que LaRbp38 interagiu com os DNAs do cinetoplasto e do núcleo *in vivo* e sugeriram que a LaRbp38 pode ter dupla localização celular e mais de uma função.

11. ANEXO: Declaração para a CEEA/IB - UNICAMP

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de doutorado intitulada "**Caracterização Bioquímica e Molecular do Componente Transcriptase Reversa da Telomerase de *Leishmania* spp.**":

- () não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.
- (X) está inserido em projeto aprovado pela CQB (Protocolo nº 164/02), publicado dia 21/05/2002 na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, SP.
- (X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 891-1).
- () tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?). (Protocolo nº _____).

Aluno

Orientador

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Nome: Prof. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
Presidente
Função: Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEE/IB - UNICAMP

Carta CTNBio 159 /02

Brasília, 22 de maio de 2002.

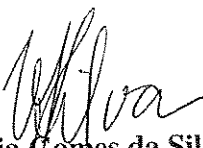
Ref.: Resultado de solicitação de emissão de Certificado de Qualidade em Biossegurança-CQB

Senhor Presidente da CIBio do Instituto de Biociências-Campus de Botucatu

Informamos a Vossa Senhoria que a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, em sua 58ª Reunião Ordinária, apreciou o processo nº **01200.007359/2001-11**, referente a solicitação de Certificado de Qualidade de Biossegurança-CQB e emitiu Parecer Técnico Prévio Conclusivo favorável, conforme o comunicado 180, publicado no DOU de 21 de maio de 2002, Seção 3, página 5..

Segue anexo, cópia da publicação do CQB nº 164/02.

Atenciosamente,


Vânia Gomes da Silva
Assessora Técnica da CTNBio

Ilmo. Sr.
Ivan de Godoy Maia
Pesquisador Responsável
Instituto de Biociências-UNESP-Campus de Botucatu
C.P 510-Distrito de Rubião Júnior
18618-000 Botucatu-SP

Ministério da Ciência e Tecnologia

AGÊNCIA ESPACIAL BRASILEIRA

EXTRATO DE TERMO ADITIVO Nº 1/2002

Número do Contrato: 7/2001
 Nº Processo: 0135000040/200133
 Contratante: AGÊNCIA ESPACIAL BRASILEIRA - AEB
 CNPJ Contratado: 24913295000155
 Contratado: MANCHESTER SERVICOS LTDA
 Objeto: Prorrogação do prazo de vigência do contrato n. 007/2001 pelo período de 12 (doze) meses, a contar do dia 28/05/2002.
 Fundamento Legal: Lei n. 8.666/93
 Data de Assinatura: 20/05/2002

(SICON - 20/05/2002) 203001-20402-2002NE900004

CENTRO DE PESQUISAS RENATO ARCHER

EDITAL DE 20 DE MAIO DE 2002
CONCURSO PÚBLICO

O Centro de Pesquisas Renato Archer - CenPRA, em cumprimento ao Edital Nº 01/2002 e Edital Nº 02/2002 - que tratam do Concurso Público de provas e títulos destinado a selecionar candidatos para o provimento de cargos, vagos de TECNLOGISTA PLENO 1, TECNLOGISTA PLENO 2 e TÉCNICO 2, da Carreira de Desenvolvimento Tecnológico, para lotação na entidade, informa o resultado provisório das Provas Escritas (Fase 1).

Notas Padronizadas
 Código da opção: 62
 Média Acertos: 19,40
 Desvio - Padrão: 5,95

N.º Inscrição	Nome	N.º Acertos	NP
02546	GERALDO FIGUEIREDO DA S FILHO	27	62,77
02534	SILVIA H VACCARI BRISTOTTI	24	57,73
02541	VIVIANE CAMILO RAMALHO	21	52,69
02529	ANDRE GONCALVES MANTOVANI	13	39,25
02547	ANTONIO WASHINGTON DE MORAES	12	37,57

Código da opção: 63
 Média Acertos: 16,00
 Desvio - Padrão: 2,00

N.º Inscrição	Nome	N.º Acertos	NP
02540	JOSE ANTONIO SBRAGIA SENNA	18	60,00
02542	ANTONIO CARLOS C DO AMARAL	14	40,00

Código da opção: 64
 Média Acertos: 13,00
 Desvio - Padrão: 2,00

N.º Inscrição	Nome	N.º Acertos	NP
02517	MARBILIA PASSAGNOLO SERGIO	15	60,00
02515	CICERO LEITE CAVALCANTE	11	40,00

Código da opção: 65
 Média Acertos: 14,33
 Desvio - Padrão: 4,27

N.º Inscrição	Nome	N.º Acertos	NP
02528	FABIO NAURAS AKHRAS	18	58,59

RESULTADO DE JULGAMENTO
CONVITE Nº 4/2002

A Comissão Permanente de Licitações torna público o Resultado do Julgamento de Propostas da Carta Convite nº 2002.1.004, para fornecimento de suprimento para informática. Foram julgadas vencedoras: Aguiar Comercio e Servicos Ltda no item 13, BBComp Comercio de Produtos para Informatica Ltda no item 23, Brasil Supri Comercial Ltda nos itens 06 a 08, Duz & Malarm Ltda-EEP nos itens 01 a 03, 17, 18, 20 e 21, Fabiana Cristina Toledo - ME nos itens 04 e 10, Marty Suprimentos para Informatica nos itens 19 e 22, S2K 2 Comercio e Servicos Ltda no item 05 e SMS - Comercio de Produtos para Informatica Ltda-ME nos itens 09, 11, 12 e 14 a 16.

MARIA MARTA MALZONE ASSUMPCAO
 Presidente da Comissão Permanente de Licitação

(SIDEAC - 20/05/2002) 240129-00001-2002NE900013

02535	JULIANO SALMAR N E TAVEIRA	18	58,59
02501	ADALBERTO NOBIATO CRESPO	17	56,33
02512	SUELI AP VARANI ELEUTERIO	15	51,56
02532	MARCIA REGINA MARTINS MARTINEZ	12	44,53
02531	SONIA THEREZA MAINTINGUER	6	30,48

Código da opção: 66
 Média Acertos: 14,11
 Desvio - Padrão: 2,18

N.º Inscrição	Nome	N.º Acertos	NP
02506	ANTONIO CARLOS DA C TELES	18	67,81
02527	ALCIDES DA SILVA NUNES JUNIOR	16	58,63
02502	JOSE ROCHA ANDRADE DA SILVA	16	58,63
02520	ROGERIO LARA LEITE	15	54,07
02538	PAULO HENRIQUE DEFENDI	14	49,49
02518	GERALDO HEINZL REBOLLA	13	44,91
02505	CARLOS R MENDES DE OLIVEIRA	12	40,33
02504	LEOBERTO REIS FELIX	12	40,33
02530	NELMO CYRILACO DA SILVA	11	35,75

Código da opção: 67
 Média Acertos: 15,45
 Desvio - Padrão: 2,19

N.º Inscrição	Nome	N.º Acertos	NP
02544	FERNANDO CHIARADIA FERNANDES	18	61,63
02524	VICTOR FELLEGRINI MAMMANA	18	61,63
02521	IZAQUE ALVES MAIA	17	57,06
02525	JOSE ROBERTO SBRAGIA SENNA	17	57,06
02503	THEBANO EMILIO DE A SANTOS	17	57,06
02539	CHRISTIANO PEREIRA GUERRA	15	47,92
02543	JESSICA TEIXEIRA RIBEIRO	15	47,92
02522	JOSE ROBERTO FILHO	15	47,92
02548	PAULO RICARDO GARCIA FERNANDES	15	47,92
02519	ASTRID DAMASCO	12	34,22
02549	MARCOS H MAMORU O HAMANAKA	11	29,63

Código da opção: 17
 Média Acertos: 21,00
 Desvio - Padrão: 3,94

N.º Inscrição	Nome	N.º Acertos	NP
02533	RICHARD LUIZ GALLO	26	62,70
02509	JOSE LUIZ DE MARCO	22	52,54
02511	HIRAM CAMPOS DE CARVALHO	21	50,00
02516	FILPE CANDIDO SILVA	15	34,76

Código da opção: 18
 Média Acertos: 19,50
 Desvio - Padrão: 5,72

N.º Inscrição	Nome	N.º Acertos	NP
02510	GERALDO APARECIDO DA SILVA	27	63,11
02513	CESAR NAZARIO DE BIAGI	21	52,60
02514	ROBSON ANTUNES	19	49,13
02507	LEANDRO AUGUSTO FERNANDES	11	35,15

De acordo com o Capítulo VI dos referidos editais, caberá recurso com relação às Provas Escritas (Fase 1), no prazo de 2 (dois) dias úteis contados da data desta publicação. Os recursos deverão observar as disposições contidas no Capítulo VI dos Editais Nº 01/2002 e Nº 02/2002.

ROMILDO MONTE
 Diretor - Substituto

(Of. El. nº 14/2002)

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE
BIOSSEGURANÇA

COMUNICADO Nº 180, DE 14 DE MAIO DE 2002

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 2º, inciso XIII, do Decreto nº 1.752, de 20 de dezembro de 1995, torna público que após visita técnica, análise e julgamento de processo envolvendo organismos geneticamente modificados pertencentes aos Grupos I e II, conforme definido no Anexo I, da Lei nº 8.974, de 05 de janeiro de 1995, a CTNBio emitiu parecer favorável, em sua última Reunião Ordinária ocorrida nos dias 08 e 09 de maio de 2002, para obtenção e extensão de Certificado de Qualidade em Biossegurança e avaliação de projetos envolvendo OGMs do grupo II, os seguintes processos administrativos:

I - Processo nº 01200.007359/2001-11

Interessado: Instituto de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu

CNPJ: 48.031.918/0022-59

Endereço: Caixa Postal 510 - Distrito de Rubião Júnior - Botucatu - SP - CEP 18618-000 - Telefone: (14) 6802.6000 - FAX: (14) 6821.3744

Assunto: Solicitação de emissão de Certificado de Qualidade em Biossegurança - CQB.

Decisão: Deferida, ficando atestada a idoneidade técnico-científica da instituição requerente, assim como das instalações dos Laboratórios de Parasitologia Molecular, de Genética Molecular de

Plantas, de Oncogenética e de Virologia para atividades de pesquisas em regime de contenção e ensino, com microrganismos geneticamente modificados, definidos pela requerente como organismos do grupo I, conforme Anexo I da Lei 8974, de 05 de janeiro de 1995. O trabalho previsto é limitado à análise de fragmentos de cDNA clonados em Escherichia coli altamente imobilizada, bem caracterizada e de amplo uso mundial para tais fins. Não há planos para expressão dos genes em alta escala, nem da clonagem de genes de qualquer organismo infeccioso ou patogênico. Não há planos para liberação de qualquer OGM. A CTNBio é composta de pesquisadores com doutorado, com competência para executar sua função. A área física disponível é adequada para o trabalho com os OGMs previstos. A CTNBio esclarece que, para as atividades de pesquisa em regime de contenção com microrganismos geneticamente modificados, a requerente deverá observar as normas estabelecidas pela Instrução Normativa nº 7, da CTNBio, publicada no Diário Oficial da União de 09.06.97, Seção 1, páginas 11.827 a 11.833 e que qualquer projeto envolvendo organismos geneticamente modificados pertencentes ao Grupo II, deverá ser submetido para análise pela CTNBio e só poderá ser executado após autorização emitida pela mesma.

CQB nº 0164/02

II - Processo nº 01200.007664/2001-03

Interessado: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

CNPJ: 15.461.510/0001-33

Endereço: Cidade Universitária - Caixa Postal 549 - CEP 79070-900 - Campo Grande - MS - Telefone: (67) 387.3311 - FAX: (67) 387.5317