

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Arina Marina Perez

**Caracterização Funcional da proteína LaRbp38 nos telômeros e no  
cinetoplasto de *Leishmania* spp.**

Campinas 2013



# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ARINA MARINA PEREZ

## “CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA LARBP38 NOS TELÔMEROS E NO CINETOPLASTO DE LEISHMANIA SPP”

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Arina Marina Perez*  
*[Assinatura]*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano

CAMPINAS,  
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

P415c Perez, Arina Marina, 1982-  
Caracterização funcional da proteína LaRbp38 nos  
telômeros e no cinetoplasto de *Leishmania* spp / Arina  
Marina Perez. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

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

1. *Leishmania amazonensis*. 2. Proteínas. 3.  
Telômeros. 4. DNA de Cinetoplasto. I. Cano, Maria  
Isabel Nogueira. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** LaRbp38 protein functional characterization in the telomeres and kinetoplast of *Leishmania* spp

**Palavras-chave em Inglês:**

*Leishmania amazonensis*

Proteins

Telomeres

Kinetoplast DNA

**Área de concentração:** Bioquímica de proteínas

**Titulação:** Doutora em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Maria Isabel Nogueira Cano [Orientador]

Jörg Kobarg

Marcelo Brocchi

Mario Henrique de Barros

José Franco da Silveira Filho

**Data da defesa:** 19-04-2013

**Programa de Pós Graduação:** Genética e Biologia Molecular

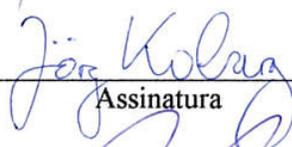
Campinas, 19 de abril de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

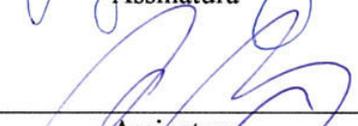
Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano (orientadora)

  
Assinatura

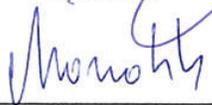
Dr. Jörg Kobarg

  
Assinatura

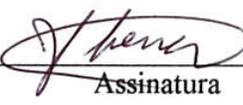
Prof. Dr. Marcelo Brocchi

  
Assinatura

Prof. Dr. Mario Henrique De Barros

  
Assinatura

Prof. Dr. Jose Franco Da Silveira Filho

  
Assinatura

Prof. Dr. Julio Cesar Borges

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Lima De Azeredo Espin

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Fábio Tebaldi Silveira Nogueira

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## Índice

<b>Ficha catalográfica</b>	II
<b>Componentes da Banca</b>	III
<b>Agradecimentos</b>	IV
<b>Lista de Figuras</b>	VII
<b>Lista de abreviações</b>	IX
<b>Resumo</b>	XI
<b>Abstract</b>	XII
<b>1.0 Introdução</b>	1
1.1 <i>Leishmania</i> e Leishmaniose	1
1.1.2 Ciclo de vida	2
1.1.3 A leishmaniose no Brasil e no mundo	3
1.1.4 Tratamentos disponíveis contra as <i>Leishmanioses</i> .	8
1.2 A biologia molecular e a organização dos genomas nuclear e mitocondrial de <i>Leishmania</i> spp.	9
1.3 Telômeros estrutura e função	10
1.3.1 A replicação dos telômeros pela telomerase	12
1.4 Função das proteínas que se associam aos telômeros de eucariotos	14
1.5 O complexo telomérico em <i>Leishmania amazonensis</i>	16
1.6 Funções conhecidas da proteína Rbp38 de tripanosomatídeos	17
<b>2. 0 Objetivos</b>	19
<b>3.0 Resultados e discussões</b>	20
3.1 Capítulo 1: Mapeamento do domínio de ligação da proteína Rbp38 de <i>Leishmania amazonensis</i> para diferentes DNAs	20
3.2 Capítulo 2: A Proteína LaRbp38 transloca entre o núcleo e cinetoplasto em formas promastigotas de <i>leishmania amazonensis</i> .	42
3.3 Capítulo 3:LaRbp38 pode fazer parte de um possível complexo shelterina-like em <i>L.amazonensis</i> .	70

<b>4.0 Conclusões Gerais</b>	88
<b>5.0 Referências Bibliograficas</b>	91

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, a toda minha família, sobretudo meus pais, Georgina e Ariovaldo, que sempre me deram todas as condições e incentivo para minha formação, me apoiando e torcendo diante de todas as minhas conquistas.

Agradeço a minha orientadora, Maria Isabel Nogueira Cano, pela oportunidade e confiança em meu trabalho, sempre me apoiando e dando todo o suporte necessário para meu crescimento científico.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial aos amigos de laboratório: Marcelo, Bárbara, João (Xiba), Rita, Camila Baldim, Vinicius, Paulo Vinicius (Rick), Douglas, Raphael (Rola), Marcela que tornaram o ambiente de trabalho mais agradável e prazeroso, além de contribuírem para a realização deste trabalho.

Agradeço meu amigo, companheiro e namorado Paulo Vinicius, que esteve sempre do meu lado ajudando, aconselhando e dando força nos momentos de cansaço e que teve muita paciência no meu stress pré-tese.

Agradeço a todos os amigos e funcionários do departamento de genética da UNESP de Botucatu, que foi o local onde desenvolvi o meu trabalho de doutorado. Aos colaboradores: Dra Agnes Takeda, Ms. Carlos Fernandes, Dra. Lisandra Gava, Shelly de Carvalho, Prof. Dr. Marcos Fontes, Prof. Dr. Hernandez Carvalho, Prof. Dr. Mario Henrique de Barros.

Agradeço a Pós-graduação de Genética da UNICAMP, em especial a secretária Lourdes e a FAPESP, agência financiadora, que tornou esse projeto possível.

## Lista de Figuras

### Introdução

Figura 1: Formas de desenvolvimento dos parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	1
Figura 2: Ilustração do ciclo de vida dos parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	3
Figura 3: Diferentes formas clínicas da leishmaniose	6
Figura 4: Estrutura dos telômeros	11
Figura 5: Complexo <i>shelterin</i> de humanos	16
Figura 6 : Panorama atual dos telômeros de <i>Leishmania</i>	17

### Capítulo 1

Figura 1: Construction and expression of LaRbp38 truncated mutants	26
Figura 2: LaRbp38 and the truncated mutants show different affinities for telomeric DNA and kDNA	27
Figura 3: Competition assays reveal the boundaries of the LaRbp38 DBD	29
Figura 4: Far UV-CD spectra indicated that DNA binding significantly alters the secondary structure of Mut2 and Mut6, at the boundaries of the mapped DBD	33
Figura 5: The boundaries of LaRbp38 DBD	34
Figura 1 Supplementary: Far UV-CD spectra of full length LaRbp38 and its truncated mutants	38
Figura 2 Supplementary: Far UV-CD spectra indicated that DNA binding does not alter the secondary structure of some LaRbp38 truncated mutants	40

### Capítulo 2

Figura 1: Western blotting utilizando soro anti-LaRbp38 mostrando a localização de LaRbp38 nos diferentes compartimentos subcelulares	51
Figura 2 : Localização subcelular de LaRbp38 mostrando o trânsito da proteína do cinetoplasto para o núcleo em formas promastigotas de <i>L. Amazonensis</i>	53
Figura 3: Microscopia confocal mostra a localização subcelular de LaRbp38	54
Figura 4: LaRbp38 co-imunoprecipita com as proteínas nucleares LaRPA-1 e LaTRF	55
Figura 5: Determinação do IC50 e ensaio de TUNEL para H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e luz U.V para confirmação de danos em <i>L. amazonensis</i>	57

Figura 6: Estudo da expressão das proteínas LaRbp38, LaRPA-1, LaOGG1 e LaTP e LaKu80, após diferentes tempos de tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e luz U.V	61
Figura 7: Modificação na localização subcelular da proteína LaRbp38 após tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e irradiação com luz U.V	63
Figura 8: LaRbp38 possui um sinal de localização nuclear atípico e interage com a importina $\alpha$ , uma proteína envolvida com o transporte de proteínas ao núcleo	65
<b>Capítulo 3</b>	
Figura 1: Interação das proteínas LaRbp38 e LaTRF	76
Figura 2: LaRbp38 possui um motivo conservado do tipo FKLAP (TRFH docking motif)	78
Figura 3: LaRbp38 e LaTRF interagem fisicamente em uma região que não contém o motivo conservado FKLAP	80
Figura 4: LaRbp38 interage com LaTRF via mutante truncado de LaRbp38 que não possui motivo FKLAP (LaRbp38mut4)	82
Figura 5: LaRbp38mut4 possui uma sequência conservada do tipo ALKTL que pode estar envolvida na interação com LaTRF	84
Figura 6: Regiões da proteína LaRbp38 que contém os diferentes motivos: FKLAP e ALKTL	85
<b>Conclusão</b>	
Figura 6: Contribuição dos resultados obtidos com a proteína LaRbp38 nesta tese	90

## Lista de Abreviações:

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

**BSA:** albumina sérica bovina

**CDC13:** proteína ciclo de divisão celular ("cell division cycle 13")

**Cdk :** ciclina dependente kinase

**CST:** complexo hetero trimérico (CDC13, Stn1, Ten1)

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DNA:** ácido desoxirribonucléico

**DNase:** desoxirribonuclease A

**DTT:** 1,4-ditiotreitol

**EDTA:** ácido etileno diamino tetracético

**Est1:** *ever short telomeres 1*

**HEPES:** ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico

**His-tag:** polyhistidine-tag: motivo de aminoácidos em proteínas, que consiste em pelo menos cinco a seis histidinas (His), inseridas no N-ou C-terminal da proteína.

**HU:** hidroxauréia

**IC50:** concentração inibitória de um fármaco capaz de provocar a morte em 50% dos organismos ou células

**IFI:** imunofluorescência indireta

**IP :** imunoprecipitação

**IPTG:** isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

**kDa:** quilo Daltons

**kDNA:** DNA mitocondrial de cinetoplasto (*kinetoplast DNA*)

**LaRbp38:** *Leishmania amazonensis RNA binding protein*

**LaRPA-1:** *Leishmania amazonensis replication protein A-1*

**LaTBP1 :** *Leishmania amazonensis telomere binding protein 1*

**LaTel :** seqüência de DNA dupla fita telomérico utilizada nos ensaios de EMSA

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

**Loading buffer:** Tampão para carregar amostra em gel SDS-PAGE

**LTA:** leishmaniose tegumentar americana

**NLS:** *nuclear localization signal*

**MLS:** *mitochondrial localization signal*

**MTT:** 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

**Mre11:** *meiotic recombination 11*

**NP-40:** nonidet P-40

**OB-fold:** *Oligonucleotide-oligosaccharide-binding fold*

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**pb:** par de bases

**PBS:** solução salina tamponada com fosfato

**PCR:** reação em cadeia da polimerase

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

**POT1:** *protection of telomeres 1*

**RNA:** ácido ribonucléico

**RNase A:** ribonuclease A

**SDS:** dodecil sulfato de sódio

**SDS-PAGE:** *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

**SIDA** : Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

**TIN2**: *TRF1-interacting protein 2*

**UMS** : Universal Minicircle sequence.

## Resumo

LaRbp38 é uma proteína exclusiva de protozoários tripanosomatídeos, entre os quais estão os agentes etiológicos da leishmaniose, uma doença endêmica presente em diversas regiões do Brasil. LaRbp38 é codificada por um gene nuclear, que parece exercer diferentes funções nas maquinarias de replicação nuclear e mitocondrial. Foi primeiramente descrita como proteína estabilizadora de RNA mitocondrial e parece estar envolvida com a replicação de DNA mitocondrial. Em *Leishmania*, LaRbp38 também interage *in vivo* com DNA mitocondrial, com sequências ricas em GT e com DNA telomérico simples e dupla fita. Nesta tese mostramos estudos que nos levaram a caracterizar novas propriedades estruturais e biológicas desta proteína. Na primeira parte da tese mostramos, que a LaRbp38 inteira e mutantes truncados da proteína são capazes de interagir com diferentes tipos de DNAs: DNA simples e dupla fitas teloméricos e kDNA, porém com diferentes afinidades. Desta forma, foi possível mapear a vizinhança de um domínio de interação desta proteína aos diferentes tipos de DNA (DBD). Como este domínio não compartilha similaridade estrutural com nenhum domínio descrito em outras proteínas, isto sugere que este pode ser um novo domínio presente exclusivamente em tripanosomatídeos. Estes resultados estão compilados no artigo intitulado: “Mapping the boundaries of the DNA-binding domain of *Leishmania amazonensis* Rbp38 (LaRbp38)”. Na segunda parte da tese, mostramos a localização subcelular da proteína e como ela é capaz de translocar por diferentes compartimentos celulares utilizando um sinal de localização mitocondrial presente no N-terminal e um sinal de localização nuclear, presente no C-terminal da proteína. Embora a proteína esteja presente de forma mais abundante no cinetoplasto, é possível visualizá-la no núcleo quando o ciclo celular do parasita é sincronizado ou quando este é submetido a um estresse genotóxico. Baseado nesses achados também foram realizados ensaios de interação proteína-proteína, onde foi possível determinar a interação entre LaRbp38 e a proteína importina  $\alpha$ , uma proteína que está diretamente ligada ao transporte de proteínas ao núcleo via NLS. Estes resultados também foram compilados em um artigo, que está em fase de preparação, intitulado: “The protein LaRbp38 translocates between the nucleus and the kinetoplast in *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes”. Um outro estudo que realizamos para compreender a função da LaRbp38, o qual também esta na forma de um artigo: “LaRbp38 can form part of a *shelterin-like* complex in *L. amazonensis* telomeres”, mostramos evidências sobre a interação entre as proteínas LaRbp38 e a LaTRF de *L. amazonensis*. Aqui, uma análise *in silico* pela busca de motivos conservados em LaRbp38, nos levou a descobrir que esta proteína contém um motivo do tipo *TRFH docking* encontrado em proteínas teloméricas que interagem com as proteínas da família das TRFs no complexo *shelterina* de vertebrados e mamíferos(ex: TIN2, PINX1 e APOLLO). Juntas, as TRFs e suas interatoras têm a função na manutenção dos telômeros. Sendo assim, utilizando ensaios de interação proteína-proteína, conseguimos mostrar que LaRbp38 interage fisicamente com a LaTRF, usando um motivo *TRFH docking* diferente daquele que foi primeiramente encontrado *in silico*. Nossos resultados mostram que a LaRbp38 interage com a LaTRF usando o motivo ALKTL, que compartilha similaridade de sequência, com motivos descritos em proteínas interatoras de TRFs e é bastante conservado entre as Rbp38 de tripanosomatídeos. Estes resultados podem indicar que a LaRbp38 cumpre função análoga a uma das proteínas de vertebrados descritas como interatoras de TRFs, a proteína TIN2, que a exemplo de LaRbp38, também tem função nas mitocôndrias.

## Abstract

LaRbp38 is a trypanosomatid protein found exclusively in these protozoa, among which are the etiological agents of leishmaniasis, an endemic disease present in several regions of Brazil. LaRbp38 is a protein encoded by a nuclear gene, which probably plays different roles in both mitochondrial and nuclear replication machineries. It was first described as a mitochondrial RNA stabilizing protein involved in the replication of mitochondrial DNA. In *Leishmania*, LaRbp38 also interacts in vivo with mitochondrial DNA, GT-rich sequences and single- and double-stranded telomeric DNA. Here we show the results that led us to characterize some new biological and structural features of this protein. In the first part of the thesis we show that the entire LaRbp38 and its truncated mutants are able to interact with different GT-rich DNAs and was possible to map the boundaries of a DNA-binding domain (DBD). This domain doesn't share any sequence or structural similarities with the domains described in other proteins suggesting that it could be a new domain present exclusively in trypanosomatids. These results are compiled in the article entitled: "Mapping the boundaries of the DNA-binding domain of *Leishmania amazonensis* Rbp38 (LaRbp38)." The second part of the thesis shows the subcellular localization of the protein and how it is able to translocate to different cellular compartments using a N-terminal mitochondrial localization signal (MLS) and a nuclear localization signal (NLS) present in the C-terminus of the protein. Although the protein is seen more abundantly in the mitochondria associated with kinetoplast DNA, its nuclear localization seems to be cell cycle dependent and enhanced at the end of S phase or when parasites are subjected to genotoxic stress. In order to confirm that the protein is able to translocate to the nucleus, we used different in silico approaches. The results strongly suggest the existence of a non-classical and also non-bipartite NLS at the C-terminus of LaRbp38. Based on these findings we did protein-protein interaction assays and verified that LaRbp38 can associate in vitro with importin  $\alpha$ , which is directly linked to protein transport to the nucleus via a NLS. These results were also compiled in an article, which is in preparation, entitled: The LaRbp38 protein translocates between the nucleus and the kinetoplast in *Leishmania amazonensis* promastigotes. Another study that was carried out and present in the third part of the thesis shows evidence about the interaction between LaRbp38 and the telomeric *L.amazonensis* LaTRF protein. These results are presented as an article entitled: "LaRbp38 can form part of a shelterin-like complex in *L.amazonensis* telomeres,". Here, an in silico analysis search for conserved motifs in LaRbp38, showed that this protein contains a motif, the TRFH-docking-like typically found in proteins that associate with the TRF paralogue proteins (TRF1 and TRF2) in the shelterin complex of vertebrates and mammalian telomeres (eg. TIN2, PINX1 and APOLLO). TRFs and their interactors work together to regulate the dynamics of telomeric chromatin and telomere length maintenance. By using protein-protein interaction assays we show that LaRbp38 physically interacts with LaTRF. This interaction, however, seems to occur via a new TRFH docking motif, which is different from the conserved core motif [FY]xLxP. This new TRFH-docking-like motif (ALKTL) aligns and share similarities with the TRH-docking motif described in the shelterin protein TIN2. This motif is also very conserved among the Rbp38 orthologues of other trypanosomatids. Curiously, TIN2 is a telomeric protein that shows nuclear and mitochondrial localization

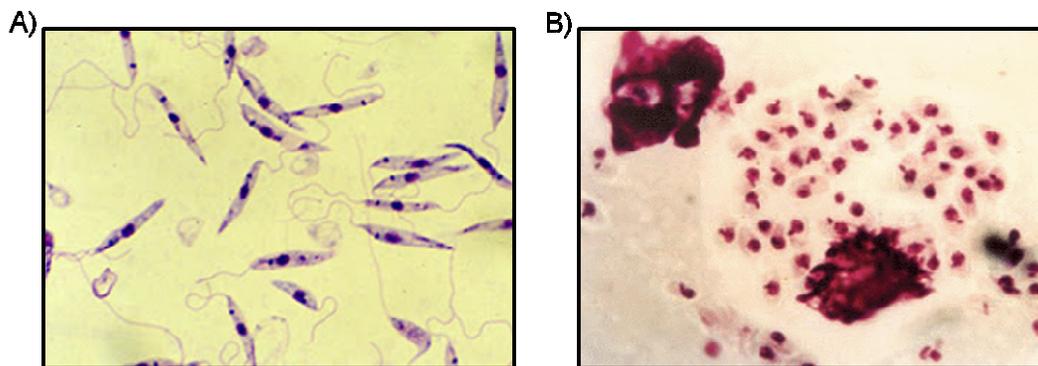
## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 *Leishmania* e Leishmaniose**

As leishmanias são protozoários flagelados, pertencentes à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, caracterizados pela presença do cinetoplasto, uma organela rica em DNA que representa um compartimento especializado de uma única mitocôndria. Todas as espécies de *Leishmania* são heteroxênicas, ou seja, necessitam de mais de um hospedeiro durante seu desenvolvimento biológico (ciclo de vida digenético). Seu ciclo de vida é caracterizado principalmente por mudanças na forma celular, ciclo celular, metabolismo, revestimento da superfície e expressão do gene. (da Silva et al., 2012).

Estes protozoários também possuem um único flagelo ligado ao corpo basal do cinetoplasto que emerge a partir de uma bolsa flagelar, que é uma invaginação da membrana plasmática (Cuvillier et al., 2000). O comprimento do flagelo é rigorosamente controlado ao longo do ciclo de vida do parasita, especialmente sob a forma promastigota, onde é essencial para a mobilidade e a sobrevivência no interior do hospedeiro invertebrado (Cuvillier et al., 2003, Gluenz et al., 2010).

No hospedeiro invertebrado formas promastigotas extracelulares flageladas vivem no tubo digestivo do inseto vetor, insetos hematófagos pertencentes à família Psychodidae (gênero *Lutzomyia*). (Neves, 2000, Rey, 2001). Os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos, embora as infecções sejam mais comuns em roedores e canídeos. A Fig. 1 mostra as duas formas de desenvolvimento do parasita.

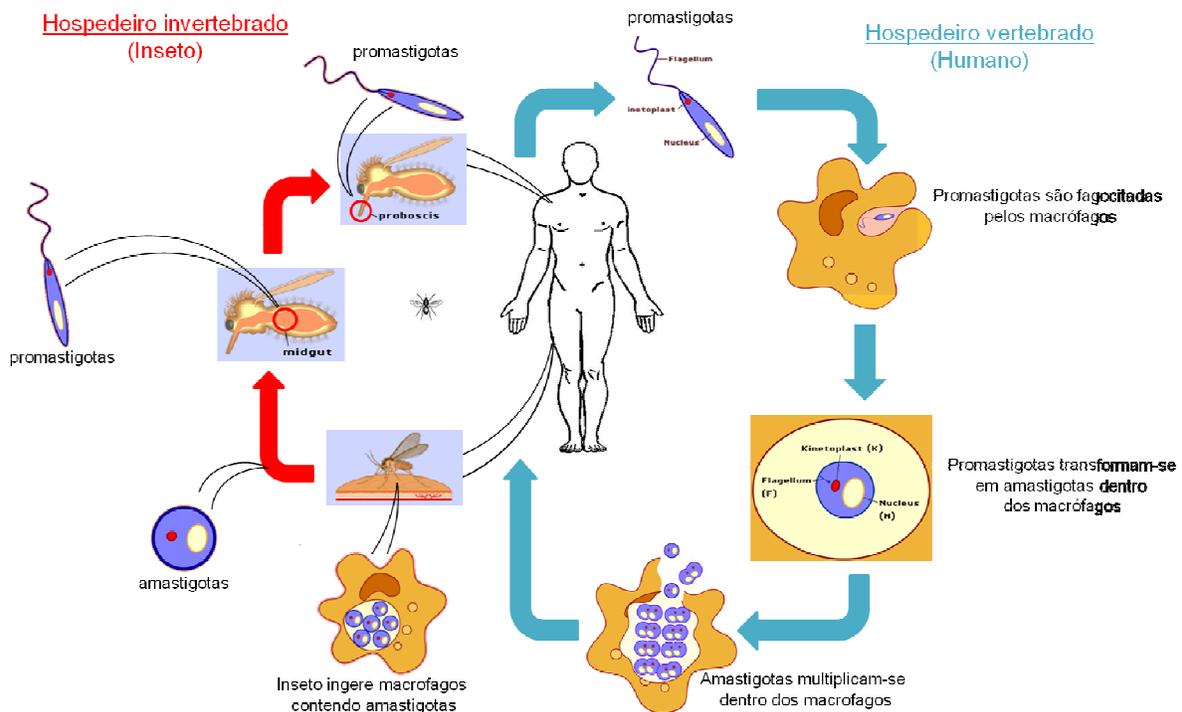


**Fig. 1 Formas de desenvolvimento dos parasitas do gênero *Leishmania*.** **A)** Parasitas na forma promastigota, flagelada, alongada e presente no sistema digestivo do inseto hospedeiro (fonte: <http://www.susanamendez.com/LeishmaniaFacts/Images/promastigote.jpg>). **B)** Parasitas na forma amastigota, com flagelo retraído, arredondada, presente no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (fonte: <http://parasito.montpellierwired.com/proto/leishmania3.jpg>).

### 1.1.2 Ciclo de vida

Esses parasitas apresentam ciclo de vida digenético, ou seja, necessitam de um hospedeiro intermediário para completarem seu ciclo de vida, passando por uma fase promastigota extracelular, no aparelho digestivo de insetos hematófagos dos gêneros *Lutzomyia* (novo mundo) ou *Phlebotomus* (velho mundo). A transmissão ao hospedeiro mamífero ocorre no momento da picada do mosquito fêmea contaminado com o parasita na forma promastigota metacíclico. No momento do repasto sanguíneo, a forma parasitária é inoculada na corrente sanguínea, sendo então fagocitada por células do sistema monocítico fagocitário, como os macrófagos. No vacúolo digestivo destas células, os parasitas passam por modificações morfológicas se transformando em formas amastigota, caracterizada pela ausência de flagelo, sendo exclusivamente intracelular, encontrada somente no hospedeiro mamífero. Estes amastigotas se dividem por bipartição até o momento em que ocorre a lise da célula hospedeira. Neste momento, os amastigotas caem na corrente sanguínea e são novamente fagocitados por novas células do sistema monocítico fagocitário do hospedeiro. De acordo com a espécie de *Leishmania* haverá afinidade por um determinado tipo de célula do hospedeiro, caracterizando as diferentes formas clínicas da doença. Caso um inseto sadio do gênero

*Lutzomyia* ou *Phlebotomus* realize um repasto sanguíneo neste paciente infectado, poderá ingerir formas amastigotas. Ao chegarem ao intestino do inseto, o parasita novamente se diferencia em promastigota, podendo novamente infectar um novo hospedeiro mamífero no momento de um novo repasto (Neves et al., 2000, Rey, 2001). A Fig. 2 apresenta de forma esquemática o ciclo de vida do parasita.



**Fig. 2: Ilustração do ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania*.** A figura representa as diferentes fases do ciclo celular de protozoários do gênero *Leishmania* nos diferentes hospedeiros: Hospedeiro invertebrado ( inseto vetor) e hospedeiro vertebrado ( mamíferos). Figura extraída de da Silva et al., 2012

### 1.1.3 A leishmaniose no Brasil e no mundo

As leishmanioses eram consideradas zoonoses de transmissão essencialmente silvestre em ambientes rurais. Hoje, no entanto, apresentam mudanças no padrão de transmissão devido a modificações sócio-ambientais, como o desmatamento e o processo migratório caracterizado pelo êxodo rural, levando o homem para as periferias das grandes cidades (dados publicados pelo

Ministério da Saúde em 2004). A dinâmica das leishmanioses varia de acordo com os locais de ocorrência e em função das variáveis relacionadas aos parasitas, aos vetores, aos ecossistemas e a características imunológicas dos hospedeiros (Neves et al., 2000, Rey, 2001).

Por apresentarem características clínicas e epidemiológicas diferentes em cada área geográfica, a leishmaniose foi subdividida em quatro grupos de doenças distintas: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea ou cutâneo–mucosa, leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose visceral, cujas características serão abaixo citadas (Rey, 2001). O parasita alvo deste estudo é a *L. amazonensis*, agente causal da leishmaniose cutânea e cutânea-difusa apresentando ampla distribuição geográfica (Neves, 2000, Rey, 2001). Setenta e cinco por cento de todos os casos clínicos de leishmaniose, distribuídos por vários continentes, são do tipo cutânea, e os 25% restantes são de casos de leishmaniose visceral (Kaye e Blackwell, 2008). Porém, em algumas regiões do Brasil, *L. amazonensis* aparece como agente causal de todo o espectro da leishmaniose (Barral et al., 1991, Almeida et al., 1996).

Existe uma grande dificuldade na classificação das espécies de *Leishmania*, devido a grande semelhança morfológica entre elas (Chance, 1979). Inicialmente a classificação era de acordo com os aspectos clínicos das doenças (Pessoa, 1961). Atualmente se aceita classificar as espécies que infectam o homem em complexos fenotípicos, agrupados em dois subgêneros cada qual contendo diferentes espécies (Lainson e Shaw, 1987): a) Subgênero *Viannia* (inclui: *brasiliensis*, *guyanensis*, *lainsoni*, *naifi*). b) subgênero *Leishmania* (inclui: *mexicana*, *infantum*, *amazonensis*, *enrietti*, *hertigi*).

No Novo Mundo, são reconhecidas oito espécies de *Leishmanias* responsáveis pela doença no homem (Grimaldi Jr. et al., 1989), pertencentes aos subgêneros *Viannia* (*V*) e *Leishmania* (*L*), a saber:

***Leishmania (V) braziliensis*** : causa lesões cutâneas e mucosas com ampla distribuição geográfica da América Central ao Norte da Argentina.

***Leishmania (V) guyanensis***: causa predominantemente lesões cutâneas e ocorre na parte da América do Sul, restrita à Bacia Amazônica;

***Leishmania (V) panamensis*** : causa predominantemente lesões cutâneas, e ocorre na América Central e Costa Pacífica da América do Sul;

***Leishmania (V) lainsoni*** : causa lesões cutâneas e ocorre no norte do Estado do Pará, na Região Amazônica do Brasil;

***Leishmania (L) mexicana*** : causa lesões cutâneas e eventualmente difusas (anérgicas) e ocorre no México e América Central;

***Leishmania (L) amazonensis***: causa lesões cutâneas e eventualmente difusas (anérgicas) e ocorre desde a América Central até o norte, nordeste e sudeste da América do Sul;

***Leishmania (L) venezuelensis***: causa lesões cutâneas e ocorre na Venezuela;

***Leishmania (L) chagasi***: causa a forma visceral com febre, anemia, hepatoesplenomegalia, emagrecimento e ocorre do México ao norte da Argentina, com predomínio no nordeste brasileiro.

As diferentes espécies do gênero *Leishmania* produzem grande variedade de manifestações clínicas que dependem da interação entre a resposta imune do hospedeiro vertebrado e da invasividade, tropismo e patogenicidade deste parasita (Wilson e Pearson, 1990). O conceito que se tem é que varias espécies de *Leishmania* que parasitam o homem induzem a uma doença espectral, com uma grande variação de manifestações clínicas. Pesquisas epidemiológicas indicam, porém que muitas infecções são assintomáticas ou subclínicas e que pacientes com sintomatologias maiores

representam apenas uma pequena porção dos casos. A OMS ([www.who.int/health\\_topics/leishmaniasis/](http://www.who.int/health_topics/leishmaniasis/)) classifica as leishmanioses em quatro formas clínicas principais (Neves et al., 2000, Rey, 2001), ilustradas na fig. 3:

- **Leishmaniose visceral (LV):** 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.
- **Leishmaniose cutânea (LC):** nesta forma os pacientes apresentam exclusivamente lesões cutâneas, limitadas, podendo ser estas ulceradas ou não.
- **Leishmaniose mucocutânea (LMC):** também conhecida com úlcera de Bauru, são as formas da doença em que os parasitas apresentam afinidade por áreas descobertas da pele e freqüentes complicações nas mucosas da boca, nariz e faringe.
- **Leishmaniose cutânea difusa (LCD):** se caracteriza pela presença de lesões disseminadas em pacientes com resposta imunitária ineficiente. Pode também ocorrer tardiamente em pacientes que tiveram leishmaniose visceral e se trataram.



**Fig. 3** Diferentes formas clínicas da leishmaniose. Em **A** um exemplo de paciente com leishmaniose do tipo tegumentar, que pode incluir as formas cutânea e cutânea difusa. Em **B** leishmaniose mucocutânea. Em **C** um caso de leishmaniose com tropismo visceral. Figuras obtidas em [www.images.google.com](http://www.images.google.com) (autoria desconhecida).

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). Atualmente, 12-15 milhões de indivíduos encontram-se infectados por alguma espécie do gênero *Leishmania* e 350 milhões de outras pessoas estão sob risco de infecção, sendo registrados cerca de dois milhões de novos casos por ano, principalmente entre indivíduos imunocomprometidos. Recentemente, a Organização Mundial de Saúde (WHO) publicou um encarte junto à revista “TDR News” (2002) situando a leishmaniose como doença de categoria I onde se enquadram doenças emergentes e ainda não controladas como a dengue e as tripanossomíases africanas (ver [www.who.int/tdr/diseases/leish/strategy.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/leish/strategy.htm)). No período de 1985 a 2005, verifica-se uma média anual de 28.568 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 18,5 casos/100.000 habitantes, verificando-se coeficientes mais elevados nos anos de 1994 e 1995, quando atingiram níveis de 22,83 e 22,94 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (Dados do ministério da saúde). É importante também citar os casos de co-infecção da leishmaniose em pacientes portadores do vírus HIV, o que 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 de leishmaniose (WHO, 1995). O crescimento acelerado dos casos de SIDA/HIV durante os últimos 20 anos modificou o espectro das leishmanioses nos campos clínico e epidemiológico (Cruz et al., 2006). 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 vírus HIV, houve um aumento do número de casos registrados, atualmente os casos já foram detectados em 35 países (Cruz et al., 2006).

#### **1.1.4 Tratamentos disponíveis contra as *Leishmanioses*.**

Não existem vacinas eficazes contra as leishmanioses (WHO, 2014). Portanto, as medidas mais utilizadas para a prevenção dessas enfermidades baseiam-se no controle de vetores e dos reservatórios como cães infectados, e na melhoria de habitação e condições de higiene da população. Devido à complexidade da interação parasito-hospedeiro, assim como os resultados contraditórios para os modelos vacinais, o controle da infecção é principalmente dependente de intervenção quimioterapêutica. Atualmente existem várias opções de tratamento, mas no Brasil, a administração parenteral de antimoniais pentavalentes (Glucantime®) vem sendo o tratamento de escolha nos últimos anos. Além da toxicidade ao paciente, a terapia com antimoniais registra um grau considerável de insucesso (Berman, 2005; Croft, Sundar et al., 2006). Os antimicrobianos, Anfotericina B e Pentamidina representam a segunda linha de tratamento. A anfotericina B lipossomal é o tratamento de escolha atual em muitos países, pela sua eficácia já demonstrada além do benefício de mínimos efeitos colaterais. Entretanto seu alto custo limita sua aplicabilidade para muitos pacientes dos países em desenvolvimento (Chappuis, Sundar et al., 2007). A Pentamidina é uma alternativa eficaz para leishmaniose cutânea, porém muito tóxica para os pacientes (Assan, Perronne et al., 1995; Antoniou and Gough, 2005). O fármaco antiparasitário Miltefosina demonstrou eficácia contra a leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral em administração oral, porém apresenta efeitos teratogênicos, o que limita a sua aplicação. Além disso, seu uso prolongado foi associado a descontinuação do tratamento, e como consequência, desenvolvimento de resistência (Seifert, 2011; Tiuman, Santos et al., 2011).

As inadequações das atuais opções de tratamento implicam no desenvolvimento urgente de novos fármacos para a cura da leishmaniose, com maior eficácia, efeitos colaterais mínimos e baixo custo. Portanto, a Organização Mundial de Saúde incentiva na forma de novos fomentos, pesquisas que levem a descoberta de novos alvos anti-parasita, tendo sido criado recentemente um banco de dados

de possíveis alvos contra doenças negligenciadas, onde pode ser encontrada a proteína Rbp38 como uma proteína candidata (<http://tdrtargets.org/>).

## **1.2 A biologia molecular e a organização dos genomas nuclear e mitocondrial de *Leishmania* spp.**

Entre as peculiaridades da biologia molecular destes parasitas podemos ressaltar o *trans-splicing* do RNA mensageiro, a edição de RNAs mitocondriais, a duplicação gênica e a transcrição policistrônica dos genes (Wirth, 1990). O tamanho do genoma nuclear haplóide é da ordem de 32,8 a 36 Mbp divididos entre aproximadamente 23-36 pares de cromossomos polimórficos (0,3 a 3,0 Mbp), os quais apresentam características espécie-específicas (Ivens C.A, et al, 2005).

Em relação ao genoma mitocondrial este está contido em uma organela celular denominada cinetoplasto, que é composta, basicamente, por moléculas de DNA agrupadas. O DNA do cinetoplasto (kDNA) representa a informação genética mitocondrial desses parasitas. É constituído por maxicírculos e minicírculos, moléculas que se concatenam formando uma rede compacta e que têm replicação autônoma. As moléculas contêm ao menos uma região conservada de 120 a 150 pares de base, razoavelmente homogênea entre os representantes de um mesmo gênero. Os maxicírculos codificam rRNA e mRNA de proteínas mitocondriais. Os minicírculos representam 95% da massa de kDNA, servem como molde para a transcrição dos maxicírculos e são bons substratos para sondas moleculares. (Simpson et al., 1980; Degraeve et al., 1994, Passos-Silva et al., 2010).

Em 2005, 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].

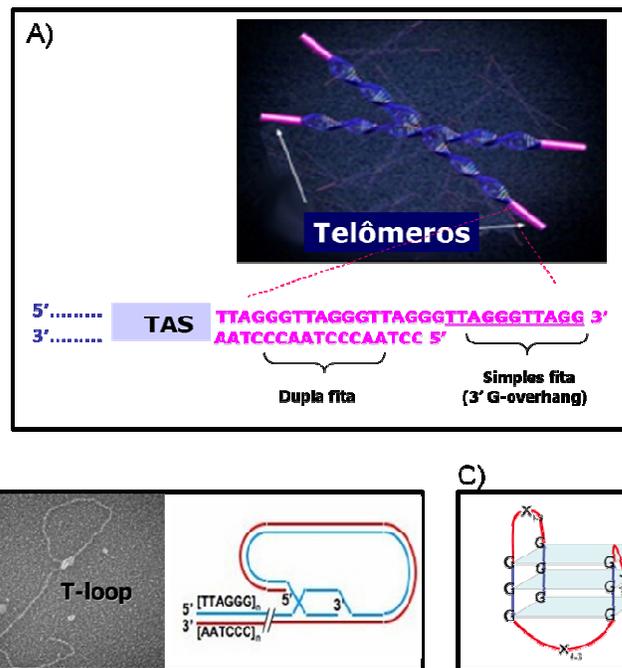
### **1.3. Telômeros estrutura e função**

Entre as estruturas que o DNA não-codificador forma nos cromossomos estão os telômeros. Eles são estruturas nucleoproteicas localizadas nas pontas dos cromossomos e funcionam como capas protetoras dessas extremidades, tendo papel muito importante na manutenção da integridade do genoma e na viabilidade celular, além de garantir a completa replicação do genoma (de Lange, 2002, Johnson 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).

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) (Fig.4A). 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 (Fig. 4B) (Fang e Cech, 1993, Zaug et al., 2005, Baird e Farr, 2006, Salas et al., 2006). Outra estrutura possível é o *T-loop*, ou *loop* do telômero (Figura 4B). 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), servindo como proteção ao final dos telômeros e impedindo o acesso da telomerase nessa região. 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, 20070).



**Fig. 4 Estrutura dos telômeros.** A) Estrutura representando os telômeros contendo regiões dupla e simples fita. B) Microscopia eletrônica das interações teloméricas na forma de *T-loop*, seguido por um esquema de uma estrutura da formação do *T-loop*, C) figura apresentando um possível modelo de estrutura do terminal telomérico, com formação do *T-loop* e *G- quadruplex* (Figura adaptada de Ogenesian e Brian, 2007).

### **1.3.1 A replicação dos telômeros pela telomerase.**

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 telomerases e os eventos de recombinação homóloga [Alberts et al., 2004, Ohki et al., 2005].

A cada evento de replicação do DNA, os telômeros estão sujeitos a perdas de seqüências de nucleotídeos que podem provocar o encurtamento destes terminais, gerando instabilidade dos cromossomos o que favorece a instalação de fenômenos de senescência, envelhecimento celular e conseqüente morte celular (Karsfelder e Greider, 2007).

A enzima responsável pela adição específica de seqüências teloméricas durante o ciclo celular, 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, 1989). 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), que carrega o molde da repetição telomérica e por algumas proteínas associadas (Lingner et al., 1997, Harrington et al., 2005).

A maioria dos organismos utiliza a telomerase para replicar os seus terminais cromossômicos. Estudos recentes mostram que à semelhança das leveduras, em humanos a telomerase estende

diferentemente os telômeros nas fitas contínua e descontínua (Chai et al., 2006) sugerindo que existe uma interação direta entre as maquinarias de replicação do DNA e a maquinaria telomérica. Além disso, em leveduras e humanos a ação da telomerase é regulada durante o ciclo celular (Taggart et al., 2002)

A atividade da enzima já foi detectada em extratos protéicos de ciliados (Greider e Blackburn, 1989), vertebrados (Morin, 1989), leveduras (Cohn e Blackburn, 1995), plantas (McKnight et al., 1997), nemátodos (Magnenat et al., 1999), insetos (Sasaki e Fugiwara, 2000) e protozoários (Cano et al., 1999, Muñoz e Collins, 2004, Giardini et al., 2006). 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, 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). Contrariamente, em camundongos e galinhas, a atividade de telomerase pode ser detectada em todos os tecidos (Prowse e Greider, 1995, Venkatesan e Price, 1998).

Em células germinativas, células tronco embrionárias e células tronco cancerígenas, a atividade de telomerase é alta e sua expressão persistente, já algumas células tronco adultas apresentam pouca (ex: células das linhagens epidermal, epitelial ou neuronal) ou nenhuma atividade enzimática (ex: células das linhagens hematopoiética e mesenquimal). Parece que nas células tronco adultas que sofrem diferenciação, os baixos níveis de telomerase podem auxiliar nas perdas teloméricas ocorridas durante esse processo, prevenindo o encurtamento prematuro dos telômeros e a perda da função telomérica. Portanto, o tamanho dos telômeros pode ser usado como um indicador indireto da história e do potencial proliferativo dessas células. A manutenção do comprimento dos telômeros

e a atividade da telomerase são processos complexos e dinâmicos que estão estreitamente ligados à regulação do ciclo celular em células tronco em humanos (Hiyama e Hiyama, 2007).

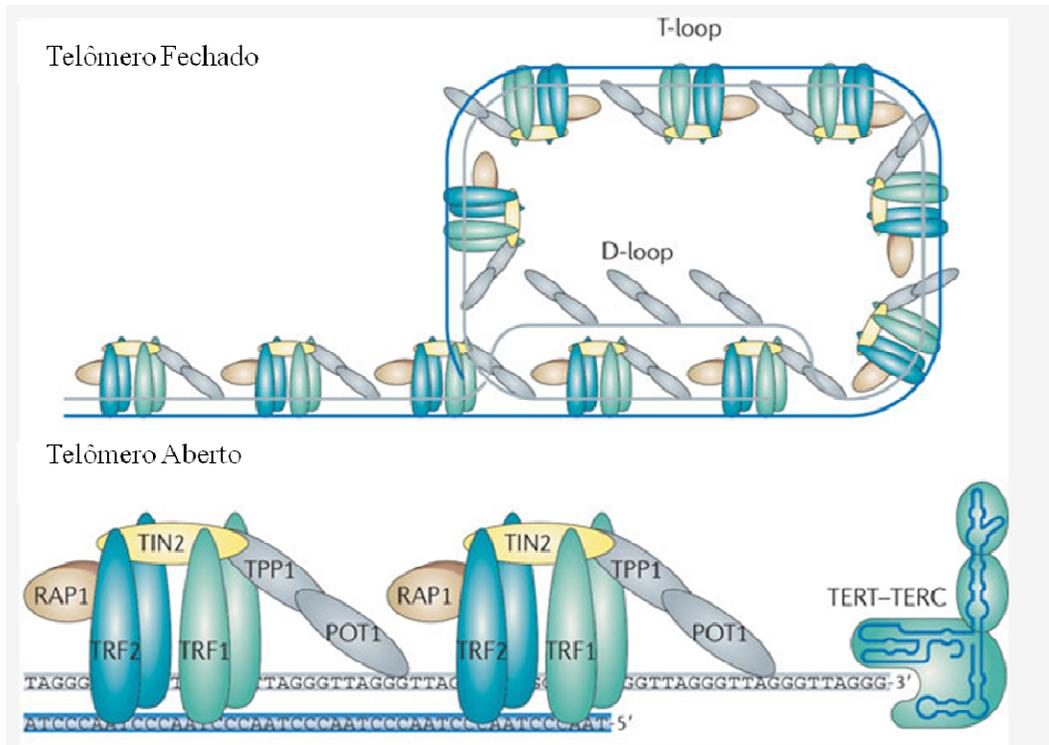
Em contraposição, nas células somáticas replicativas normais não ocorre a expressão da telomerase e os telômeros encurtam progressivamente a cada evento de mitose. Quando os telômeros atingem um tamanho muito curto, as células entram em crise e ativam vários mecanismos de *checkpoint* de ciclo celular 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 na manutenção da 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).

#### **1.4 Função das proteínas que se associam aos telômeros de eucariotos**

Integradas aos telômeros existem um grande número de proteínas que se associam ao DNA telomérico simples fita rico em G que formam complexos importantes para a atividade do mesmo. Funcionam usualmente como capas protetoras dos telômeros e têm o potencial de interagir direta ou indiretamente com a telomerase (proteína responsável pela alongação dos telômeros) regulando a sua atividade enzimática (Evans, 1999 e Scharamke et al., 2004). Em humanos e em outros eucariotos, por exemplo, Pot1 (*protection of telômeros*) se associa ao DNA telomérico simples fita

(*ssDNA*) com grande afinidade, cumprindo a função direta de proteger os terminais dos cromossomos (Baumann, 2001 e Shakirov et al., 2005). Em leveduras, é a proteína Cdc13 que cumpre função semelhante, permitindo o acesso da telomerase aos terminais cromossômicos pela sua interação direta com Est1, um componente da telomerase (Evans, S e Lundblad, V, 1999; Nugent et.al, 1996). Curiosamente, a maioria dessas proteínas que interage com DNA telomérico simples fita, compartilha um domínio de ligação ao DNA do tipo *oligonucleotide-oligosaccharide fold (OB fold)*, demonstrando conservação dos mecanismos de proteção terminal em eucariotos (Mitton-Fry et.al, 2002).

A maioria das proteínas que sabidamente interagem com a dupla fita telomérica possui no mínimo um domínio do tipo *Myb* (ou homeodomínio) originalmente descritos em proteínas *c-myb* de mamíferos (Hondoka et.al., 2001). Em mamíferos e tripanosomas as proteínas TRF e seus homólogos, se associam ao DNA telomérico como homodímeros usando um único domínio do tipo *Myb* localizado na porção C-terminal (Broccoli et al., 1997, Li et al., 2005). Essas proteínas que se associam a dupla fita telomérica atuam como reguladores negativos da manutenção dos telômeros e algumas como a TRF2 estão envolvidas na formação de *t-loops*. A afinidade das proteínas pelo DNA telomérico é regulada por uma terceira classe de proteínas, as quais não interagem diretamente com o DNA (ex. em leveduras Rif1-Rif2/Rap1, em vertebrados e mamíferos TIN2/TRF1-TRF2) mas formam complexos de alto peso molecular com as proteínas teloméricas (Li, B e de Lange, 2003., de Lange, 2005). Em humanos, um complexo não estático denominado de *shelterina* ( Fig.5) é formado por seis proteínas: TRF1, TRF2 e POT1 que interagem diretamente com o DNA e TIN2, TPP1 e RAP1 que não interagem com o DNA. No caso, POT1 tem a função primordial de também interagir com as 5 proteínas do complexo e juntamente com TPP1 regulam diretamente o acesso da telomerase ao DNA telomérico (Xin et al., 2007). Portanto, o complexo *shelterina* sofre constante remodelamento atuando junto com fatores de reparo de DNA para transformar e proteger os telômeros (de Lange, 2005).

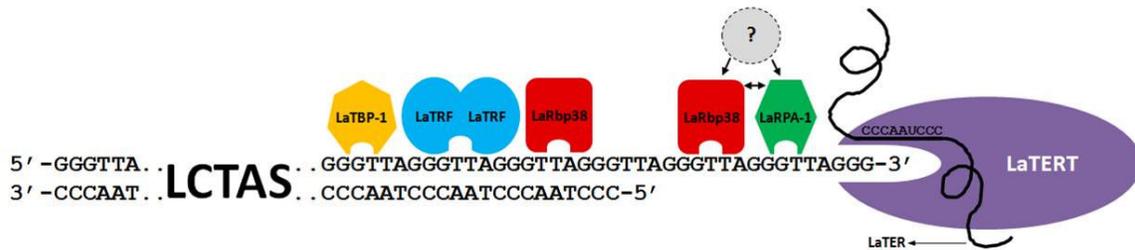


**Fig.5:** Complexo *shelterina* de humanos. A cromatina telomérica de mamíferos contém uma série de proteínas que interagem com DNA. Na forma de t-loop (telômero fechado) ou forma não-replicativa, as proteínas TPP1 e POT1 formam um complexo com o DNA telomérico via TIN2 e TRF1/2 e a telomerase tem seu acesso bloqueado aos telômeros. Na forma aberta ou forma replicativa, o complexo TPP1/POT1 recruta e estimula a atividade enzimática da telomerase em telômeros curtos (figura extraída de Martínez e Blasco, 2011).

### 1.5 O complexo telomérico em *Leishmania amazonensis*

Em *Leishmania amazonensis* foi detectado a existência de três complexos protéicos que se associam *in vitro* ao DNA telomérico simples fita rico em G (Fernandez et al., 2004). Em nosso laboratório, além da enzima telomerase (LaTERT, *L. amazonensis telomerase reverse transcriptase*), responsável pela replicação dos terminais cromossômicos, duas proteínas que compõem dois desses complexos foram identificadas utilizando-se métodos bioquímicos (Cano et al., 1999; Giardini et al., 2006). São elas as proteínas LaRbp38 (*L. amazonensis RNA binding protein 38*) e a proteína LaRPA-1 (*L. amazonensis Replication Protein A 1*) (Fernandez et al., 2004). Ambas também interagem e co-localizam com os telômeros do parasita *in vivo* (Lira et al., 2007b, Siqueira Neto et al., 2007), sendo que LaRpa-1 também está envolvidas nos mecanismos de

resposta a danos no DNA e proteção dos telômeros (da Silveira et al., 2013). Também foram identificadas proteínas que se associam *in vitro* e *in vivo* a dupla-fita telomérica. Entre elas estão LaTBP1 (*Leishmania amazonensis* Telomere Binding Protein 1), LaRbp38, alvo deste estudo (Lira et al., 2007b e 2007c) e LaTRF (*L. amazonensis* TTAGGG Repeat Binding Factor), (da Silva et al., 2010). A Figura 6 apresenta o panorama atual da composição dos telômeros de *L. amazonensis*.



**Fig 6. Panorama atual dos telômeros de *Leishmania*.** O DNA telomérico é composto por uma porção dupla-fita, formado pela repetição TTAGGG em tandem, sequências subteloiméricas (LCTAS - *Leishmania* Conserved Telomere Associated Sequences) e uma protrusão 3'G-overhang. As formas coloridas representam as proteínas já identificadas interagindo com o DNA telomérico na forma de dupla fita: LaTRF, LaTBP1, LaRbp38 e simples fita: LaRbp38, LaRPA-1 e a enzima telomerase (LaTERT) com seu componente RNA intrínseco contendo o modelo reverso da sequência telomérica ( Lira et al., 2007) Figura retirada de da Silva, et al., 2012.

### 1.6 Funções conhecidas da proteína Rbp38 de tripanosomatídeos

A primeira descrição sobre a proteína Rbp38 (Sbicego et al., 2003), mostra que ela provavelmente funciona como ligante e estabilizadora de RNA simples e dupla fita nas mitocôndrias dos parasitas, embora não apresente nenhum domínio conhecido de ligação a RNA. Essa proteína é codificada por um gene nuclear, e parece ser conservada somente entre protozoários da família dos tripanosomatídeos, pois não existem homólogos conhecidos nos bancos de dados públicos. Posteriormente, Rbp38 foi isolada de extratos nucleares, em coluna cromatográfica de afinidade, como sendo o componente protéico do complexo telomérico LaTG2 (Fernández et al., 2004). Ela é capaz de interagir *in vitro* com o DNA telomérico simples fita rico em G, demonstrando alta afinidade por uma sequência de RNA cognata a essa fita telomérica de *Leishmania*. Em trabalho no nosso laboratório, foi possível mostrar que LaRbp38 interage *in vivo* com DNA telomérico na forma de dupla fita e na forma de simples fita, DNA microsatélite rico em

GT e com kDNA de *L. amazonensis* (Lira et al., 2007). LaRbp38 também foi descrita como apresentando 70% de identidade a outra proteína de *Trypanosoma cruzi*, denominada de TC38. Esta última é uma proteína nuclear de 38 kDa que reconhece sequências poli [dT-dG] presentes em regiões intergênicas de *T. cruzi* (Duhagon et al., 2003). Também foi sugerido que Rbp38 de *T. brucei* (p38) pode desempenhar algum papel na replicação de minicírculos de kDNA, pois foi encontrada interagindo com a sequência universal de mini-círculo (UMS, Universal Minicircle Sequence). Experimentos de super-expressão da proteína fusionada a GFP mostram que a Rbp38 de *T. brucei* tem localização mitocondrial e nenhuma proteína foi detectada no núcleo do parasita (Liu et al., 2006). A importância do estudo desta proteína está em que ela pode estar envolvida nas maquinarias de replicação do DNA mitocondrial e nuclear, o que a torna um alvo interessante e promissor para o desenvolvimento de fármacos que ataquem exclusivamente protozoários tripanosomatídeos.

O objetivo central deste trabalho é aprofundar nossos conhecimentos sobre a importância da LaRbp38 nos telômeros de *Leishmania* e tentar desvendar algumas de suas funções, já que há poucos relatos sobre esta proteína.

## **2. Objetivo Geral**

O objetivo principal deste projeto de doutorado foi caracterizar as possíveis funções nucleares e mitocondriais da proteína LaRbp38. Para tal se propôs estudos funcionais *in vivo* e *in vitro* como a seguir.

### **2.1 Objetivos específicos:**

- A) Mapeamento de um possível domínio de ligação da LaRbp38 a diferentes tipos de DNAs, utilizando-se proteínas recombinantes (LaRbp38 inteira e mutantes truncados) e DNAs reconhecidos como alvos de interação da proteína, em ensaios de interação proteína-DNA.
- B) Estudo da localização subcelular da LaRbp38, utilizando análises *in silico* para a busca de motivos conservados, microscopia de fluorescência e confocal com parasitas em situação ambiental normal e após indução de estresse genotóxico.
- C) Identificação de parceiros ou interatores de LaRbp38 utilizando ensaios de interação proteína-proteína.

### **3.0 Resultados e Discussão**

De acordo com os resultados obtidos, esta tese foi dividida em 3 capítulos, compilados separadamente em três artigos, sendo que um destes está em revisão na revista *International Journal of Biological Macromolecules*, e os outros dois estão em fase de preparação.

#### **3.1 Capítulo 1**

##### **Mapeamento do domínio de ligação da proteína Rbp38 de *Leishmania amazonensis* para diferentes DNAs.**

###### **Resumo**

LaRbp38 é uma proteína exclusiva dos tripanosomatídeos, a qual não compartilha similaridade de sequência ou domínio estrutural com nenhuma outra proteína descrita nos bancos de dados públicos. Em *leishmania amazonensis*, Rbp38 (LaRbp38) é uma proteína multifuncional, encontrada no núcleo e no cinetoplasto desses parasitas. LaRbp38 é capaz de interagir com DNAs simples e dupla fita ricos em GT, embora não apresente em sua sequência nenhum domínio reconhecido em outras proteínas que apresentem esta mesma função. Neste trabalho mutantes truncados e a proteína LaRbp38 inteira foram expressos em sistema bacteriano e usados em ensaios de interação proteína-DNA na tentativa de mapear o domínio de ligação da proteína a diferentes tipos de DNA, que sabidamente são alvos de interação com LaRbp38. Os resultados mostram o mapeamento de um DBD (*DNA Binding Domain*) localizado entre os resíduos de aminoácido 95-283, o qual mostra preferência de associação com kDNA e DNA simples fita telomérico. Também foi possível determinar que essa interação altera significativamente a estrutura de LaRbp38, na região onde foi mapeado o DBD.

## Mapping the boundaries of the DNA-binding domain of *Leishmania amazonensis*

### Rbp38 ( LaRbp38)

Arina M. Perez<sup>a</sup>, Carlos Alexandre H. Fernandes<sup>b</sup>, Lisandra M. Gava<sup>c</sup>, Cristina Braga B. Lira<sup>a</sup>, Agnes A. S. Takeda<sup>b</sup>, Marcelo Santos da Silva<sup>a</sup>, Marcos Roberto M. Fontes<sup>b</sup> and Maria Isabel N. Cano<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Genética and <sup>b</sup>Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 18618-970, Botucatu, SP, Brazil. <sup>c</sup>Chemistry Institute, University of Campinas UNICAMP, Campinas SP 13083-970, Brazil.

### Abstract

Rbp38 is a protein expressed exclusively in trypanosomatid parasites. In *Leishmania amazonensis*, Rbp38 (LaRbp38) is multifunctional and is found in the kinetoplast and in the nucleus. LaRbp38 binds double- and single-stranded GT-rich DNAs, although it does not share any structural or functional domains with other known proteins. In this report, truncated overlapping mutants were used to map the boundaries of the DNA-binding domain (DBD) of LaRbp38. Proteins were tested for their ability to bind different DNAs previously identified as LaRbp38 targets. A DBD was mapped between residues 95-283 of the 348-amino acid polypeptide, with binding preferences to kDNA and single-stranded telomeric DNA. DNA binding significantly alters the secondary structure of two truncated mutants of LaRbp38, mainly at the boundaries of the mapped DBD.

### 1. Introduction

*Leishmania amazonensis* is the causative agent of tegumentar leishmaniasis in the Americas. In Brazil, this species causes a wide spectrum of clinical leishmaniasis for which there are no efficient methods of control and the currently available treatments are ineffective [1,2]. Opportunistic *Leishmania*/HIV co-infections are very common and it is therefore crucial to find new drug targets and develop new strategies to combat the disease [3,4]. Rbp38 was initially identified as a non-essential RNA-binding protein from trypanosomatid mitochondria that modulates RNA stability and may also play a role in the replication of kDNA minicircles through its interaction with the

universal minicircle sequence (UMS) [5,6]. Rbp38 orthologues described in *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* share high identity with Tc38, a DNA-binding protein of *Trypanosoma cruzi* that interacts with poly[dT-dG] sequences, including the kinetoplast UMS. Tc38 is constitutively expressed but undergoes changes in its intramitochondrial distribution throughout the parasite cell cycle and is found associated with kDNA in G1 phase [7,8]. A *Leishmania amazonensis* orthologue (LaRbp38) that was affinity-purified with LaRPA-1 (*L. amazonensis*, replication protein A one) and with DNA polymerase alpha in telomerase-positive nuclear extracts, interacts with G-rich single-stranded telomeric DNA, but not with double-stranded DNA bearing a 3' G-overhang tail [9]. LaRbp38 also binds to single- and double-stranded telomeric DNA *in vitro* and *in vivo*, to the kinetoplast UMS and to other GT-rich nuclear DNAs [10], which suggests that this protein may have more than one intracellular location and more than one function in the cell. Indeed, we have detected LaRbp38 in the kinetoplast and nucleus and found that this protein shuttles between these two compartments during the cell cycle (Perez & Cano, in preparation). In promastigotes, LaRbp38 occurs mainly in the kinetoplast, although in late S and G2 phases the protein can be clearly seen in the nucleus. Using PSORTII, a predictor of protein intracellular location [11], LaRbp38 was formerly classified as a nuclear protein (score k = 23) with a 30.4% chance of also being mitochondrial ([10] and unpublished data). However, *in silico* analyses have shown that LaRbp38 and its trypanosomal counterparts share no sequence or structural similarities with any other known protein [10].

In this report, we show that the high-affinity sequence-specific interaction between LaRbp38 and its known DNA sequence targets (telomeric single- and double-stranded DNA and kinetoplast UMS) is mediated predominantly by a DNA-binding domain (DBD) located in a central region of the protein between residues 95-283. However, a role for other parts of the protein in these interactions cannot be excluded. We show by circular dichroism (CD) analysis that this binding domain consists mainly of partially unfolded and probably contains subdomains since all

overlapping mutants of LaRbp38 show different binding preferences to single- and double-stranded GT-rich DNAs in EMSA assays. CD spectroscopy analysis also showed that DNA binding produced significant changes in the secondary structure of LaRbp38, with these changes being particularly evident in a region covered by Mut2 and Mut6 (residues 95-283) where is probably the core of the minimum LaRbp38 DBD.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Parasite cultures and extraction of genomic DNA**

Promastigotes of *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) and parasite genomic DNA were obtained as described elsewhere [10].

### **2.2. Expression and purification of full length LaRbp38 and its truncated mutants**

Six overlapped truncated mutants of the *LaRbp38* gene (GenBank accession number AY485300) were designed and each one was obtained by amplification of *L. amazonensis* genomic DNA using the primer sets listed in suppl. Table 1. All of the mutants were cloned into the pCR<sup>®</sup> 2.1 cloning vector (Invitrogen), sequenced and subcloned into a pET28a+ expression vector (Novagen). Mut1–Mut3, Mut5 and Mut6 were expressed in *E. coli* in non-soluble form. These mutants and the recombinant full length LaRbp38 were partially purified as previously described [10]. Mut4 was expressed in soluble form and was purified on a Hi-trap chelating affinity column using starting buffer (20 mM phosphate buffer, 500 mM NaCl and 25 mM imidazol) followed by elution buffer (200 mM phosphate buffer, 500 mM NaCl and 500 mM imidazol) and subsequent dialysis in 100 mM phosphate buffer, 10 mM EDTA and 100 mM NaCl to remove the imidazol. OD<sub>260/280nm</sub> was used to check for nucleic acid contamination. The purity of each protein was checked in Coomassie blue-stained 15% SDS-PAGE. CD spectroscopy was used to determine the secondary structure of the proteins.

### **2.3. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)**

All of the conditions for the binding reactions and EMSA, including the incubation temperature and the protein and probe concentrations, were previously tested and based on results described elsewhere [9,10]. Six micrograms (approximately 0,6  $\mu$ M of each purified recombinant protein) was the minimum amount of each protein able to bind 1 pmol of the following labeled probes: G-rich single-stranded telomeric DNA (Tel1, 5' -TTAGGG<sub>3</sub> -3'), double-stranded telomeric DNA (LaTel formed by annealing ssTel78G, ssTel78C) and kDNA, represented by the replication origin of minicircles (UMS, 5'-TTTCGGCTCGGGCGGTGAAAAGTGGGGGTTGGTGTAATAAT-3') [10]. Probes were 5'-end-labeled with  $\gamma$ [<sup>32</sup>P]ATP as described [9,10]. The binding buffer, binding reaction and running conditions for the EMSA using single-stranded DNAs (Tel1 and kDNA) as probes were as described by Fernandez et al. [9]. The binding buffer, binding reaction and running conditions for the EMSA using double-stranded DNA (LaTel) as the probe was as described in Lira et al. [10]. In both cases, reactions were also done in the presence of 50 ng of both poly (dI.dC) and poly (dA.dT) as non-specific competitors. After electrophoresis, the gels were dried under vacuum and exposed to X-ray film at -80°C.

### **2.4. Competition assays**

The reactions were done as described above and elsewhere [10]. LaRbp38 and Mut1–Mut6 (0,6  $\mu$ M each) were pre-incubated for 10 min with a 50 fold excess (50 pmol) of unlabeled competitor, followed by incubation with 1 pmol of radiolabeled Tel1, kDNA and LaTel using the same conditions for each specific binding assay. The percentage of binding activity as an indicator of complex formation by each protein in the absence and presence of competitors was determined using the protocol described by Fernandez et al. [9]. The data were presented as average  $\pm$  SEM and analyzed with GraphPad prism.

### **2.5. CD spectroscopy**

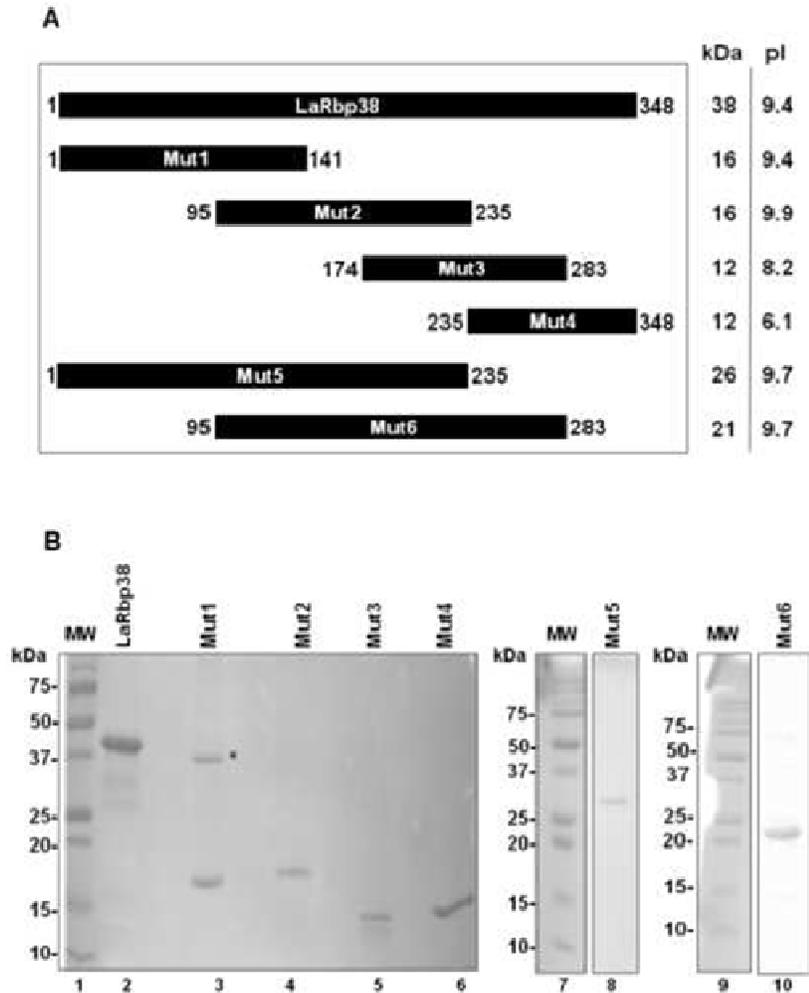
CD measurements were obtained over the spectral range of 195-260 nm in a JASCO model J-815 CD spectropolarimeter (JASCO Inc., Tokyo, Japan) equipped with a Peltier thermo-controller. The experiments were done at 293 K using an optical path length of 0.5 mm, a scanning speed of 50 nm/min, a bandwidth of 2 nm and a response time of 1 s. Twenty spectra were acquired, averaged and corrected for the buffer solution (baseline) and then normalized to the residual molar ellipticity  $[\theta]$ . LaRpb38 (300  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), Mut1 (320  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), Mut2 (412  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), Mut3 (560  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), Mut5 (670  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) and Mut6 (412  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) were analyzed in 50 mM glycine-NaOH buffer, pH 8.0. Binding assays for CD measurements were done by incubating 300  $\mu\text{g}$  of each protein with 50 pmol of unlabeled Tel1, kDNA or LaTel in binding buffer A (50 mM glycine-NaOH buffer, pH 8.0), containing 4 mM Hepes pH 8.0, 1.6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 32  $\mu\text{M}$  EDTA pH 8.0 and 1.6% Mut4 alone was analyzed at 420  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  in 100 mM phosphate buffer, pH 8.0. In this case, the binding assays were done by incubating Mut4 (300  $\mu\text{g}$ ) with 50 pmol of Tel1, kDNA or LaTel in in binding buffer B (100 mM phosphate buffer, pH 8.0), containing 4 mM Hepes pH 8.0, 1.6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 32  $\mu\text{M}$  EDTA pH 8.0 and 1.6% glycerol. The spectra of binding buffers A and B in the absence and in the presence of DNA were recorded and subtracted from the protein spectrum and from the protein:DNA spectrum, respectively. It is also important to emphasize that buffer and any of the tested DNAs had negligible circular dichroism signal in these experimental conditions.

### **3. Results and Discussion**

#### **3.1. LaRbp38 and some of the truncated mutants interact differently with GT-rich DNAs**

For this study, we constructed six truncated overlapping mutants in order to map the boundaries of the LaRbp38 DBD (Fig. 1A). LaRbp38 and mutants were expressed with an N-terminal 6x His-tag in *E. coli* and purified recombinant proteins were obtained (Fig. 1B, lanes 1-10). We observed that most of the proteins were repeatedly obtained in high degree of purity although a protein contaminant, that contrary to the other protein bands is not recognized by the anti-LaRbp38 immune

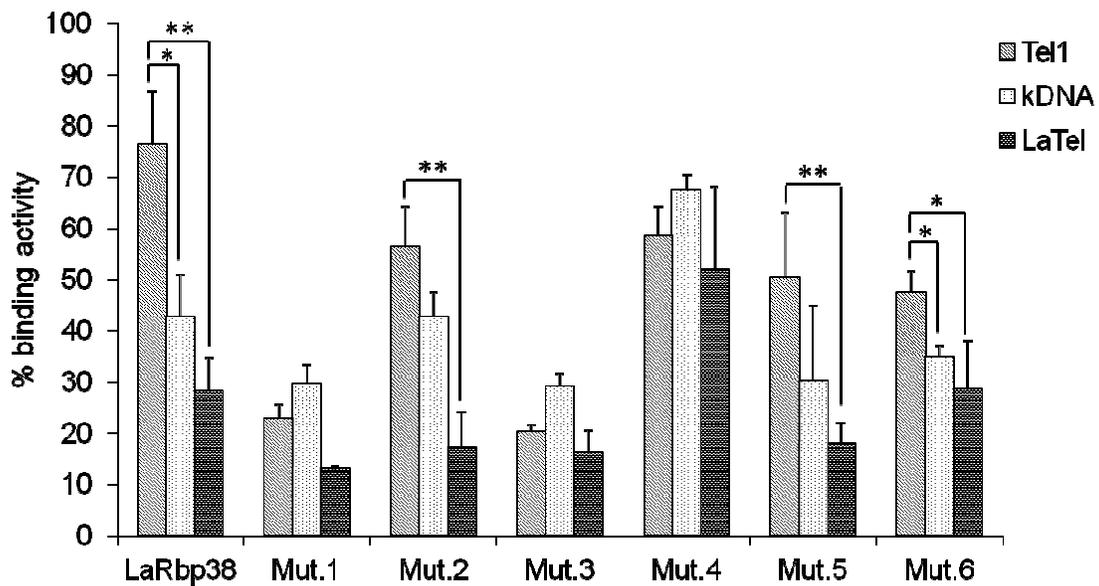
serum, always appear co-purifying with Mut1. The nature of this contaminant is still unknown. The molecular mass and isoelectric points (pI) of each protein were estimated using ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Fig. 1A).



**Fig.1. Construction and expression of LaRbp38 truncated mutants.** A) The structure of full length LaRbp38 and the position of each truncated mutant (Mut1-Mut6). Numbers indicate the positions of the amino acid residues in LaRbp38 and in each mutant. Diagram is not to scale. The estimated molecular mass and the corresponding isoelectric point (pI) of each protein without the 6x His-tag are indicated. B) Electrophoretic profile of the proteins in Coomassie blue-stained 15% SDS-PAGE. Lane 2– LaRbp38, lane 3– Mut1, lane 4– Mut 2, lane 5– Mut3, lane 6– Mut 4, lane 8– Mut 5 and lane 10–Mut6; MW, Molecular weight standards are in lanes 1, 7 and 9. The asterisk (\*) in lane 2 denotes a non-specific protein band that is co-purified with Mut1.

CD spectroscopy analysis showed that all proteins have a minimum at ~ 205-208 nm suggesting that they are partially unfolded (suppl. Fig. 1A-G).

EMSA and competition assays were used to examine the ability of each mutant to bind *in vitro* DNA sequences previously characterized as *in vivo* targets of LaRbp38 [9,10]. The DNA sequences used in the present study were the G-rich single-stranded telomeric DNA (Tel1), double-stranded telomeric DNA (LaTel) and kDNA, represented by the replication origin of minicircles (UMS) [10] (see Material and methods for details about DNA sequences). In both assays, recombinant LaRbp38 was used as a control. In Fig. 2, the graph represents the results of triplicates of each independent EMSA in the presence of high concentrations of non-specific DNA (see Material and methods for details) as summarized in Table 1.



**Fig. 2. LaRbp38 and the truncated mutants show different affinities for telomeric DNA and kDNA.** The graph represents the average  $\pm$  SEM of three independent experiments and analyzed with GraphPad prism. Recombinant proteins were used in binding reactions with labeled Tel1 kDNA and with LaTel as the labeled probes. *P* values were calculated using Student's *t* test (\**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01).

**Table 1. Binding activity of full length LaRbp38 and truncated mutants to each specific target DNA**

Protein	% Binding Activity ( $\pm$ SEM)		
	Tel1	kDNA	LaTel
LaRbp38	76.3 $\pm$ 10.3	42.7 $\pm$ 8.3	28.3 $\pm$ 6.4
Mut1	22.9 $\pm$ 2.7	29.6 $\pm$ 3.8	13.2 $\pm$ 0.4
Mut2	56.4 $\pm$ 7.9	42.7 $\pm$ 4.8	17.2 $\pm$ 6.9
Mut3	20.3 $\pm$ 1.4	29.2 $\pm$ 2.5	16.3 $\pm$ 4.2
Mut4	58.4 $\pm$ 5.8	67.3 $\pm$ 3.1	52 $\pm$ 16.1
Mut5	50.4 $\pm$ 12.6	30.2 $\pm$ 14.7	18.1 $\pm$ 3.9
Mut6	47.4 $\pm$ 4.2	34.9 $\pm$ 2.1	28.6 $\pm$ 9.4

LaRbp38 and half of the mutants interacted strongly with Tel1 with binding activities around 47-76%, whereas Mut1, Mut3 and Mut6 showed binding activities in the range of 23-58%. These results suggested that the binding domain for Tel1 in LaRbp38 involved a region covered by Mut2-Mut4, which mapped to residues 95-283.

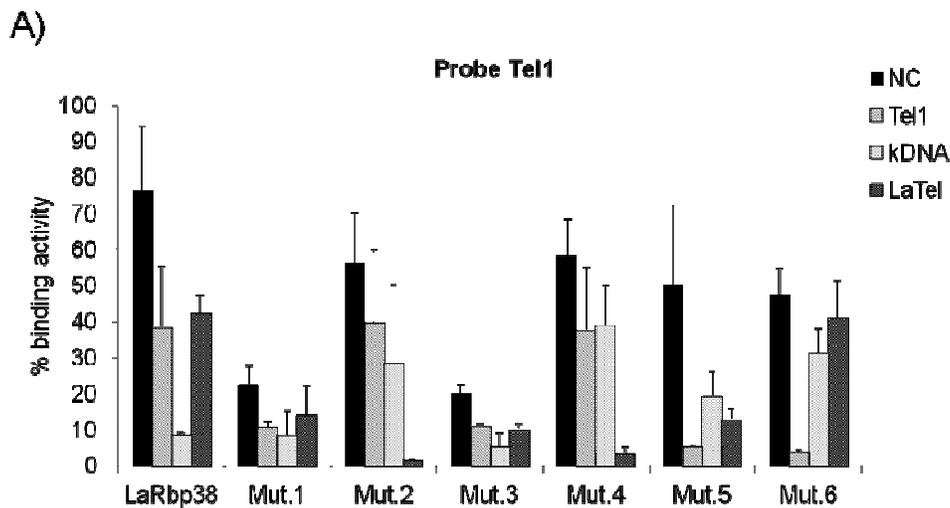
In addition to their interaction with Tel1, LaRbp38 and all mutants bound strongly to kDNA. Binding reactions done with Mut4 yielded a protein:DNA complex with ~67% binding activity. Mut1 and Mut3, Mut5 and Mut6 showed similar binding activities (~29-35%) and of LaRbp38 and Mut2 was ~43%. The protein:DNA complex formed between Mut2 and Mut4 was stronger than the others, suggesting that LaRbp38 probably has two subdomains that interact with Tel1 and kDNA, since Mut2 and Mut4 do not overlap (see Fig. 1A). These results suggest that although most of LaRbp38 binds kDNA strongly, the nature of this interaction probably differs from that involving Tel1 and deserves more investigation.

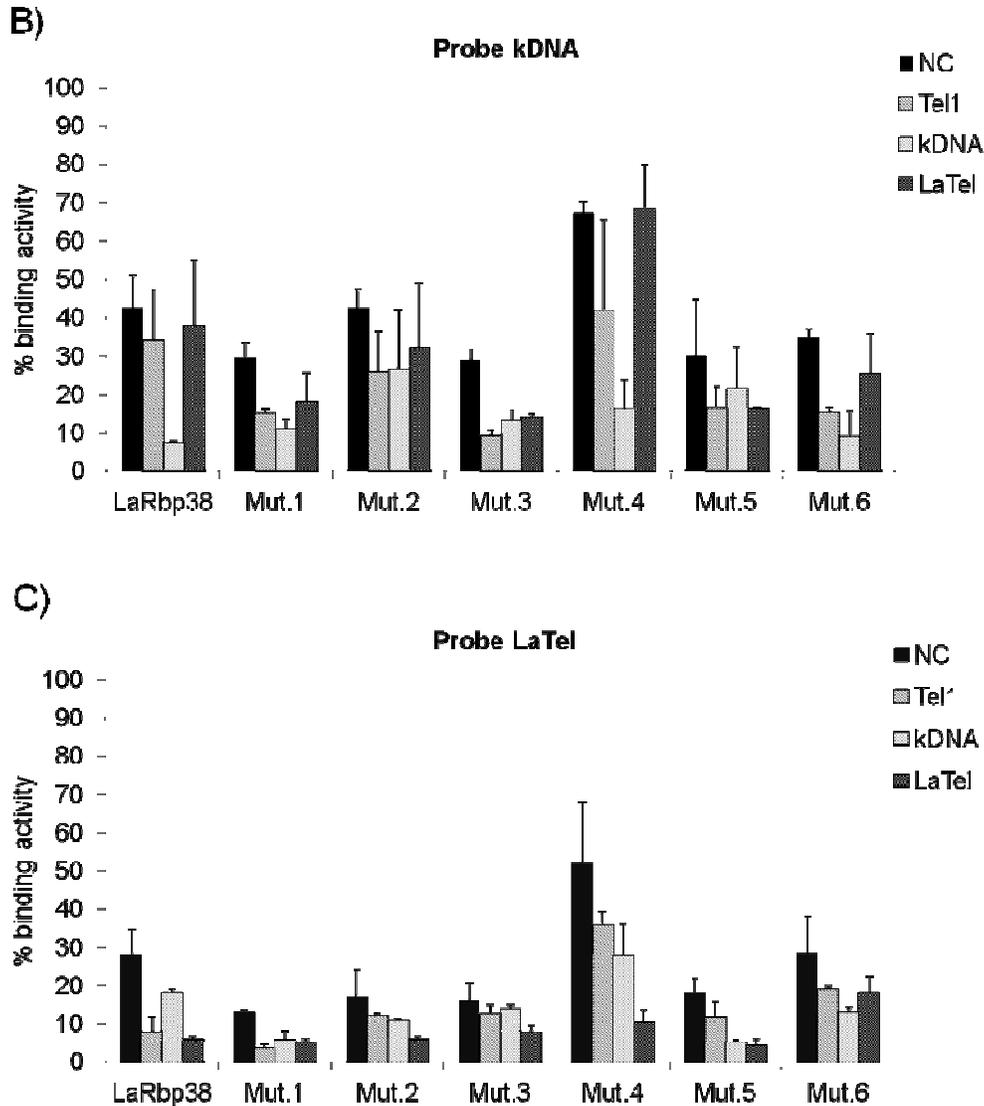
EMSA assays done with LaTel as target show that LaRbp38, Mut2, Mut5 and Mut6 showed similar binding activities (~18-28%). Mut1 and Mut3 showed binding activities of 13% and 16%, respectively and Mut4 binding activities of 52% with LaTel, suggesting that the binding domain for LaTel in LaRbp38 also involved a region covered by Mut2 and Mut.6.

In summary, the high binding affinity of Mut4 for all three DNAs and the results for Mut2 and Mut6 suggested that the DBD of LaRbp38 is located within a region harboring these mutants (residues 95-283).

### 3.2. The boundaries of the LaRbp38 DBD

To test the specificity of the putative LaRbp38 DBD in recognizing related GT-rich sequences, cross-competition assays were done using Tel1 (Fig. 3A), kDNA (Fig. 3B) and LaTel (Fig. 3C) as probes. The binding activities of control reactions done with a specific labeled probe in the absence of competitors were plotted for comparison. The percentage of binding activity in all experiments represented the complexes formed in the absence and presence of competitors.





**Fig. 3. Competition assays reveal the boundaries of the LaRbp38 DBD.** In A-C binding assays done with LaRbp38 and Mut1–Mut6 in the presence of unlabeled Tel1, kDNA and LaTel as competitors (50 pmol). NC, no competitor added to the reaction. A) Labeled probe: Tel1 (1 pmol). B) Labeled probe: kDNA (1 pmol). C) Labeled probe: LaTel (1 pmol). In all assays the amount of each complex formed in the presence of unlabeled competitor was expressed as the percentage of binding activity (% binding activity). The results are the average  $\pm$  SEM of three independent experiments and analyzed with GraphPad prism.

Fig. 3A shows the binding results obtained with Tel1 as the probe. Compared to the controls, the binding activities of Mut2 and Mut4 were respectively 40 and 37% affected by Tel1 as the unlabeled specific competitor, whereas the binding activities of LaRbp38, Mut1 and Mut3 were inhibited from 50-60% and those of Mut5 and Mut6 were almost completely abolished. When the

assays were done with kDNA as the competitor, the binding activities decreased by 30% to >80%, with the order of inhibition being: LaRbp38>Mut4>Mut6>Mut3>Mut1>Mut2.Mut5. Competition assays using LaTel as competitor showed that the binding activity of Mut5 and Mut6 decreased ~35%, while those of Mut1, Mut2 and Mut3 decreased 58, 65 e 51% respectively, and those of LaRbp38 and Mut4 were abolished in ~ 80%, suggesting that LaRbp38 and Mut4, bind preferentially LaTel and kDNA.

When competition assays were done with kDNA as the probe (Fig. 3B), the binding activities of LaRbp38, Mut4 and Mut6 were attenuated 70-80% by kDNA, whereas the activities of Mut5>Mut2>Mut1>Mut3 diminished ~30-54%. The binding activities of LaRbp38 and Mut6 were less affected in the presence of LaTel. Competition with Tel1 reduced the binding activities of LaRbp38, Mut2 and Mut4 in 36-50% and of Mut1, Mut3, ~50%. And of Mut5 e Mut6 competition with Tel1 reduced the binding activities in 90%. Altogether these results strongly suggest that LaRbp38 and Mut4 bind preferentially kDNA.

Fig. 3C shows competition assays done with LaTel as the probe. Except for LaRbp38 and Mut4, the binding activities of the other mutants were reduced by >~50% in the presence of LaTel. In the presence of Tel1 the binding activities of LaRbp38 and Mut1 were reduced by >70% whereas of Mut2-Mut6 diminished ~20-30%. When competition assays were done with kDNA, the binding activity of Mut3 was unaltered, of LaRbp38 and Mut2 was attenuated by ~36% and of Mut1, Mut4, Mut5 and Mut6 diminished ~50-70%.

In conclusion, when competition assays were done with Tel1 as the probe, the binding activity of Mut2 and Mut4 showed to be the more competed in the presence of LaTel. When competition assays were done using kDNA as the probe, the binding activities of Mut4>Mut2=Mut6 were the less affected by Tel1 and LaTel. When assays were done with LaTel as the probe, Mut2, Mut3 and Mut6 showed negligible differences in their binding activities and to be the less competed in the presence of Tel1 and kDNA. Altogether these findings indicate that, as LaRbp38, the truncated

mutants interacted differently with the probes used in this study. Whereas Mut2 showed higher binding specificity for LaTel>Tel1>kDNA, the binding activity of Mut4 was the less competed and showed higher binding specificity for kDNA>LaTel>Tel1. Mut6 in contrast, showed higher binding specificity for Tel1>kDNA>Latel, suggesting that the boundaries of the LaRbp38 DBD probably reside in a region covered/overlapped by all these three mutants (amino acids 95-283). Since the binding activity of Mut3 was much less specific for all DNA tested, our findings also suggest that this DBD is subdivided in two smaller subdomains, one restricted to the N-terminal of Mut2 (residues 95-174) and the other restricted to a smaller region covered by both Mut3, Mut4 and Mut6 (residues 235-283, see Suppl. Fig. 2 and Fig.1A for details). Thus, although the DNA-binding properties of Mut4 are comparable in parts to that of LaRbp38, we cannot exclude the possibility that the limits of this DBD may extend towards Mut2 and Mut6 N-terminus; or even that LaRbp38 indeed contains two subdomains arranged in tandem. In agreement with this hypothesis, Mut2 also showed high affinity for kDNA and the telomeric probes.

### **3.3. DNA binding results in changes in the secondary structure of LaRbp38 at the DBD**

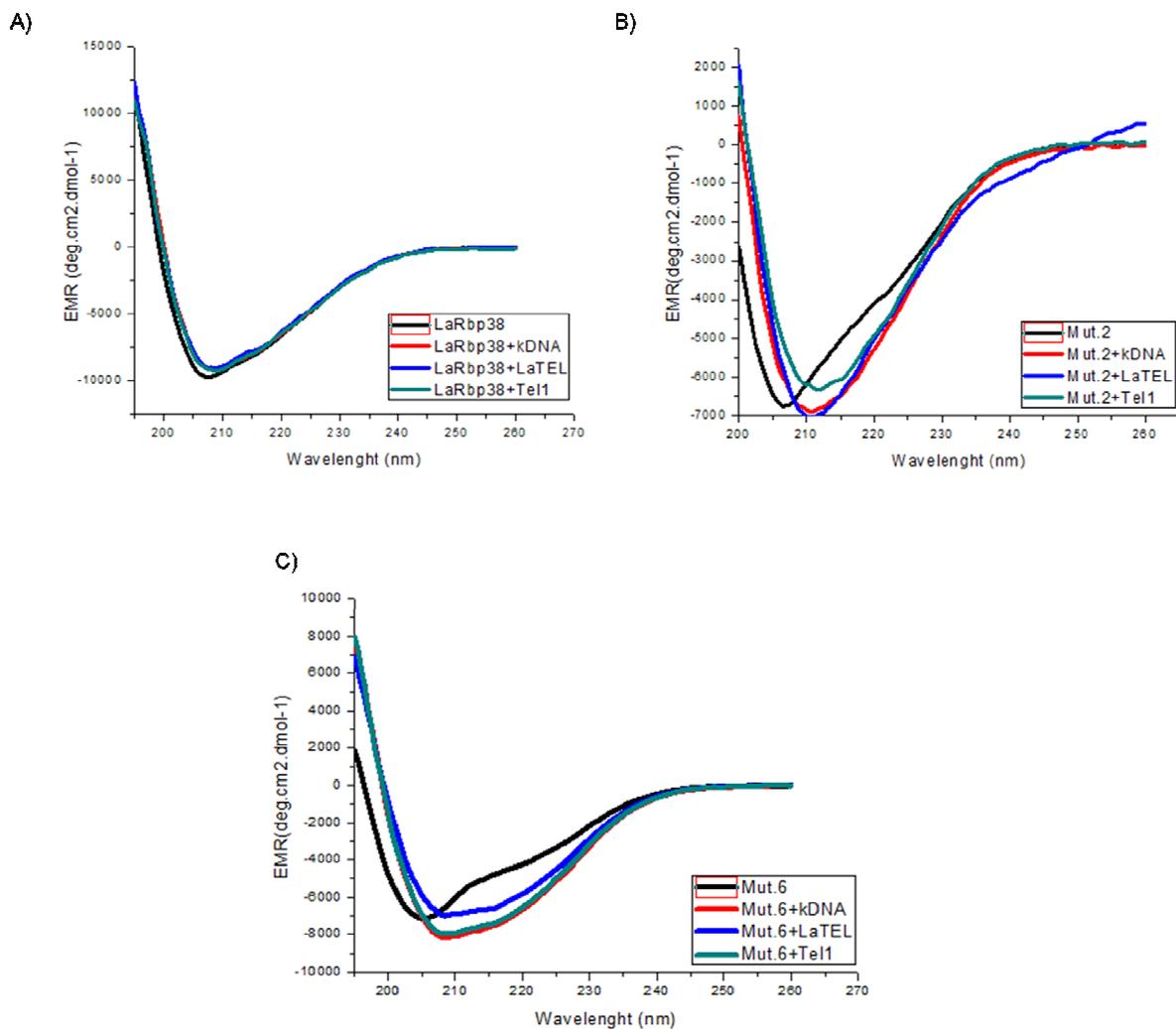
#### **boundary**

CD spectroscopy was used to examine the secondary structure of LaRbp38 and its truncated mutants and also to test the impact of the binding of Tel1, kDNA and LaTel on the secondary structure of these proteins.

CD spectra of the proteins in the absence of DNA showed that full length LaRpb38 showed a negative peak at 208 nm. The CD spectra of Mut1 had a minimum at 208 nm, of Mut2, Mut4, Mut5 and Mut6 had a minimum at 205 nm and of Mut3 had a minimum at 210 nm (suppl. Fig. 1A-G). Altogether the results show that most of the proteins are partially folded suggesting that some of them acquired a more folded state in the presence of DNA (see Figs. 4B and 4C).

Binding assays done with all DNAs (Tel1, kDNA and LaTel) induced small changes or did not alter the secondary structure content of full length LaRbp38 (Fig. 4A) and of the truncated proteins

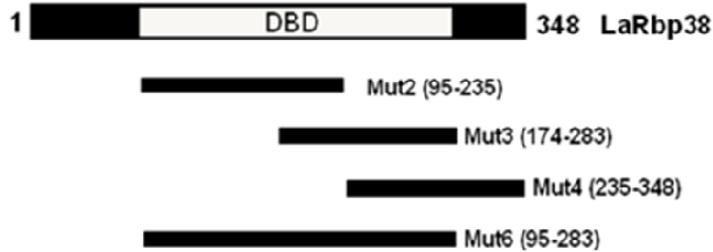
Mut1, Mut3, Mut4 and Mut5 (suppl. Fig. 2A-D). In contrast, Tel1, kDNA and LaTel induced visible conformational changes in the secondary structure content of the truncated proteins Mut2 and Mut6 (Figs 4B and 4C). The CD spectrum of Mut2 and Mut6 in the absence of DNA had a minimum at 205 nm and the addition of any of the tested DNAs resulted in changes in secondary structure, which was confirmed by the enhanced signal towards 208 nm and also from 210-222 nm, regions usually sensitive to alpha and beta secondary structures. This indicates that, in the presence of DNA occurred an increase of folded secondary structural elements in these mutants.



**Fig. 4.** Far UV-CD spectra indicated that DNA binding significantly alters the secondary structure of Mut2 and Mut6, at the boundaries of the mapped DBD. LaRbp38 (A), Mut2 (B), and Mut6 (C) in the apo form (black) and in the presence of different types of DNA: kDNA (red), LaTel (blue) and Tel1 (green).

These results are in agreement with that shown in EMSA and competition assays, showing that although most of LaRbp38 is able to binding DNA, the core of its minimal DBD is probably located in a region covered by Mut2 and Mut6 located between residues 95-283 (Fig.5A). However, and as discussed before, we cannot discard the possibility of a DBD divided in two subdomains since full length LaRbp38 and principally Mut3 and Mut4 are also able to bind DNA although by CD analysis they did not show detectable structural alterations.

A)



B)

1 MLRRVLSALLQRVATGAVIATAGRTIVVFSQQHHILESNQRARNSPSNVWIEDWEADRLGMKPEFGALPTQ  
 LVLDKQLELFNFDQLLSPPEVMEAPKHSSYSRKYGERLQFELNDRAQRHSYQSKWWITRGQAKENLQFKANARS  
 SILLTKSQIKLFHSSQLSGGEALQQYFVSGGSRVYSKKGEAFQLLDHIKSNDFNSGLYFTRRQMEFFKLAPLPD  
 QLPVLQEATTGDRHLIYNVDQLEDPHLALKTLQRAPVNVPTFLLSGEPIMSENTRKFPKTFRSNYWLTGRDAELYQ  
 WPIKESKRRGVPFSTGTSSPVQYELFNVEQLSNPDEAFARAGLLIQ 348

LaRbp38	95	APKHSSYSRKYGERLQFELN-DRAQRHSYQSKWWITRGQAYKENLQFKANARSSILLT	153
LtRbp38	95	APKHSSYSRKYGERLQLELNDRAQRHSFQSKWWITRGQAYKENLQFKANARSSILLT	154
TbRbp38	87	APKHSSYSRKYGEKLFELN-DRAQRHSYQSKWWITRGQAYKENLQFKANARSSILLT	145
Tc38	87	APRHSSYSRKYGEKLFELN-DRAQRHSYQSKWWITRAQAIKNSLTFKGGARSSILLT	145
		***:*****:***:***: *****:*.::*****:*** * : * * * .:*.***:*	
LaRbp38	154	KSQIKLFHSSQLSGGEALQQYFVSGGSRVYSKKGEAFQLLDHIKSNDFNSGLYFTRRQ	213
LtRbp38	155	KSQIKLFHSSQLSGGEALQQYFVSGGSRVYKKGAEAFQLLDHIKSNDFNSGLYFTRRQ	214
TbRbp38	146	KSSLRLYHSSQLVGGGEALMTHPVSGGSRKLYSRKGDAYQVLCHEIRQNAFNSGLYFTRRQ	205
Tc38	146	KSSLKLFHSSQLIGGEALMTHPVSGGSRKLYSKKGEAFQILSDYIRQNKFNNSGLYFTNRQ	205
		***:*****:***:***: *****:*.::*****:*** * : * * * .:*.***:*	
LaRbp38	215	MEFFKLAPLPDQLPVLQEATTGDRHLIYNVDQLEDPHLALKTLQRAPVNVPTFLLSGEPI	274
LtRbp38	216	MEFFKLASLPDQLPVVQEATTGDRHLLYNVDQLEDPHLALKTLQRAPVNVPTFLLSGEPI	275
TbRbp38	206	LEFFKLAVQPSQAPVMDVSSGERFLIFNVEQLEDPEVALRTLDRSPVSIPTFLLSGEPM	265
Tc38	206	LEFFKLAVQPSQTPVSLDVTSGDRYLIYNVEQLEDPELALKTLDRSPVNIPTFLLSGEPI	265
		:***** *.* ** :.::*.*:***:*****:***:***:***:*****:***:*****:***	
LaRbp38	275	MSENTRKFP	283
LtRbp38	276	MSENARKFP	284
TbRbp38	266	QHEGVKRLP	275
Tc38	266	QNESLKKLP	275
		*. :.::*	

**Fig.5. The boundaries of LaRbp38 DBD.** A) Diagram shows the position of LaRbp38 minimum DBD located between residues 95 and 283. This domain includes a region overlapped by Mut2 and Mut6. Diagram is not to scale. B) The amino acid sequence of LaRbp38. The residues in Mut2 and Mut6 (95-283) comprising LaRbp38 minimal DBD are highlighted in gray. B) ClustalW alignment showing the conservation of LaRbp38 DBD (residues 95-238). LaRbp38 (GenBank accession no. AY485300) and its orthologues in *L. tarentolae* LtRbp38 (GenBank accession no. AAO39844), *T. brucei* TbRbp38 (GenBank accession no. AAO39843) and *T. cruzi* Tc38 (GenBank accession no. AY357259).

Together, the results described here strongly indicate that the boundary of LaRbp38 DBD is restricted to a region in the central portion of the polypeptide located between residues 95 and 283 and that this DBD should be partially unfolded, acquiring a more folded state in the presence of the ligand, in this case, any of the tested DNAs.

The LaRbp38 DBD includes regions overlapped by practically all six mutants (Fig. 1A), which after a search for protein homologues done with the protein-protein algorithm BLASTP [12] and extensive analyses *in silico*, revealed that LaRbp38 does not share any structural similarity with other known DNA-binding proteins (data not shown). In addition, no known motifs were found using the program Pfam [13] and predictors of DNA binding sites (DBD Threader, 2ZIP, NPS) also failed to identify potential binding sites based on the amino acid sequences of LaRbp38 DBD and Tc38 [7]. Moreover, no descriptions of nucleic acid binding motifs were found in a detailed literature search. These findings indicate that LaRbp38 and its orthologues contain a novel DBD that is probably exclusive to trypanosomatids (Fig. 5B).

We also speculate that, rather than showing specificity for GT-rich sequences, LaRbp38 prefers telomeres and mitochondrial DNA because they form particular DNA structures; this binding pattern is characteristic of other proteins with functional roles in both mitochondria and the nucleus [14,15].

In conclusion, we were able to map the boundaries of LaRbp38 DBD and to provide the first evidence for the presence of a structural DBD in LaRbp38, but in order to ensure the cellular functions played by LaRbp38 in *Leishmania*, additional structural studies are needed. Our results

also added important information about a protein that is exclusive from trypanosomatid protozoa and which is probably implicated with kDNA and telomere maintenance.

### **Acknowledgments**

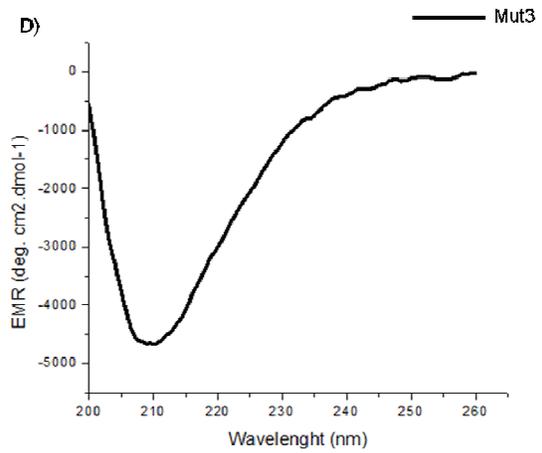
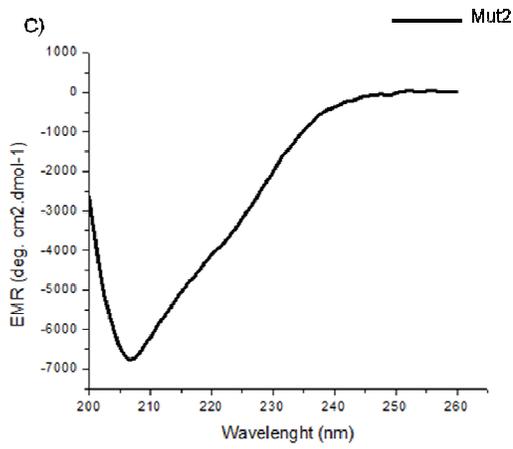
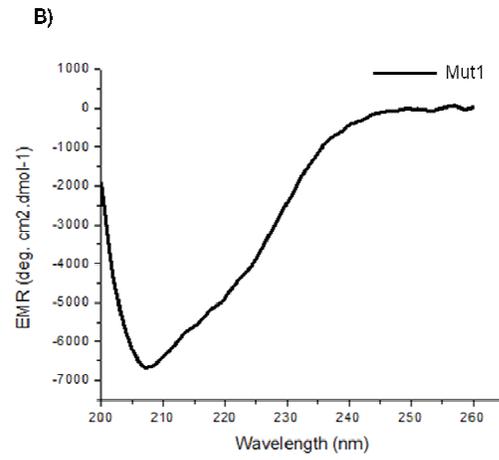
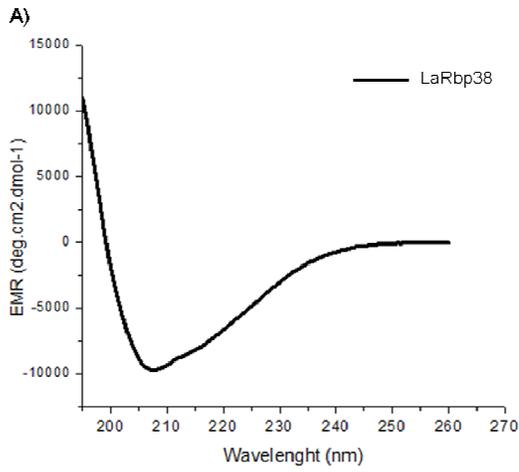
The authors thank members of Dr. Cano's and Dr. Fontes' laboratories for helpful discussions and Dr. Hyslop for editing the English. And we acknowledge Dr. Carlos Ramos for critically reading of this manuscript. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). AMP, MSS and CAHF were supported by doctoral fellowships from FAPESP and AAST and LMG were supported by post-doctoral fellowships from FAPESP.

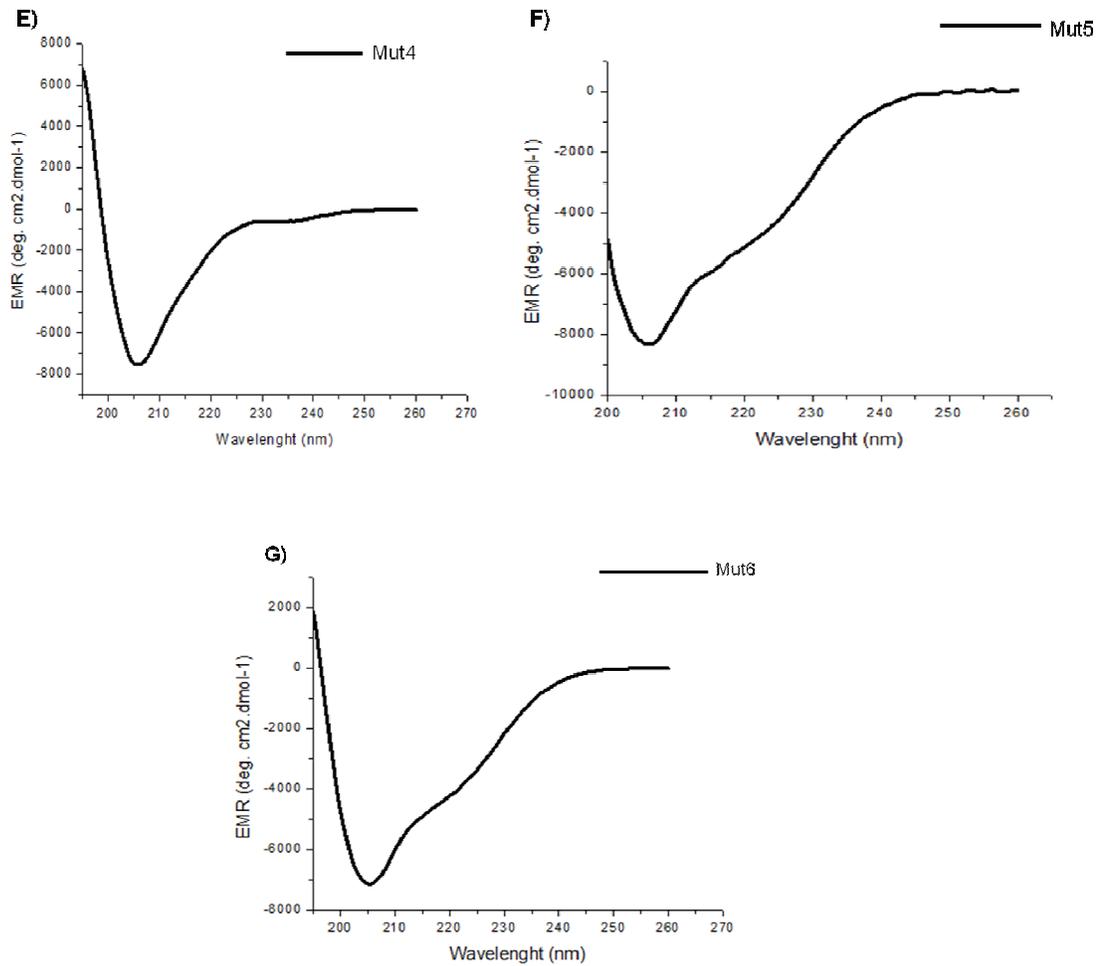
### **References:**

- [1] A.Barral, D.P. Sampaio, G.J. Grimaldi, H. Momen, D. McMahon-Pratt, A.R. de Jesus, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46 (1991) 44:536.
- [2] H.W. Murray, J.D. Berman, C.D. Davies, N.G. Saravia, *Advance in leishmaniasis* 77 (2005) 366:1561 .
- [3] I. Cruz, J. Nieto, J. Morenot, C. Cañavate, P. Desjeux, J. Alvar, *Indian Journal of Medical Research* 88 (2006) 123:357.
- [4] M. Ouellette, M. Olivier, S. Sat, B. Papadopoulou, *International Journal of Medical Sciences* 9 (2003) 19:900.
- [5] S. Sbicego, J. Alfonso, A. Esteve, M. Rubio, X. Kang, C.Turck, M. Peris, L. Simpson, *Eukaryot Cell* 8 (2003) 2:56.
- [6] B. Liu, H. Molina, D. Kalume, A. Pandey, J.D. Griffith, P.T. Englund, *Molecular Cell Biology* 93 (2006) 26:5382.
- [7] M. Duhagon, B. Dallagiovanna, M. Ciganda, W. Ruyechan, N. Williams, B. Garat, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 8 (2003) 309:183.
- [8] M. Duhagon, L. Pastro, J. Sotelo, L. Pérez, D. Maugeri, S. Nardelli, S. Schenkman, W. Noreen, B. Dallagiovanna and B. Garat. *BMC Microbiology* (2009) 9:34.
- [9] K. Fernandez, R. Castellari, F. Conte, F. Gozzo, A. Sabino, H. Pinheiro, J.C. Novello, M.N. Eberlin, M.I. Cano, *European Journal of Biochemistry* 63 (2004) 271:3050.
- [10] C.B. Lira, J.L. Siqueira Neto, M.A. Giardini, F.V. Winck, C.H. Ramos, M.I. Cano, *Biochemical Biophys Research Communication* 60 (2007) 358:854.
- [11] K. Nakai, P. Psort, *Trends in Biochemical Sciences* 5 (1999) 24:34.
- [12] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, *Nucleic Acids Research* 02 (1997) 25:3389.

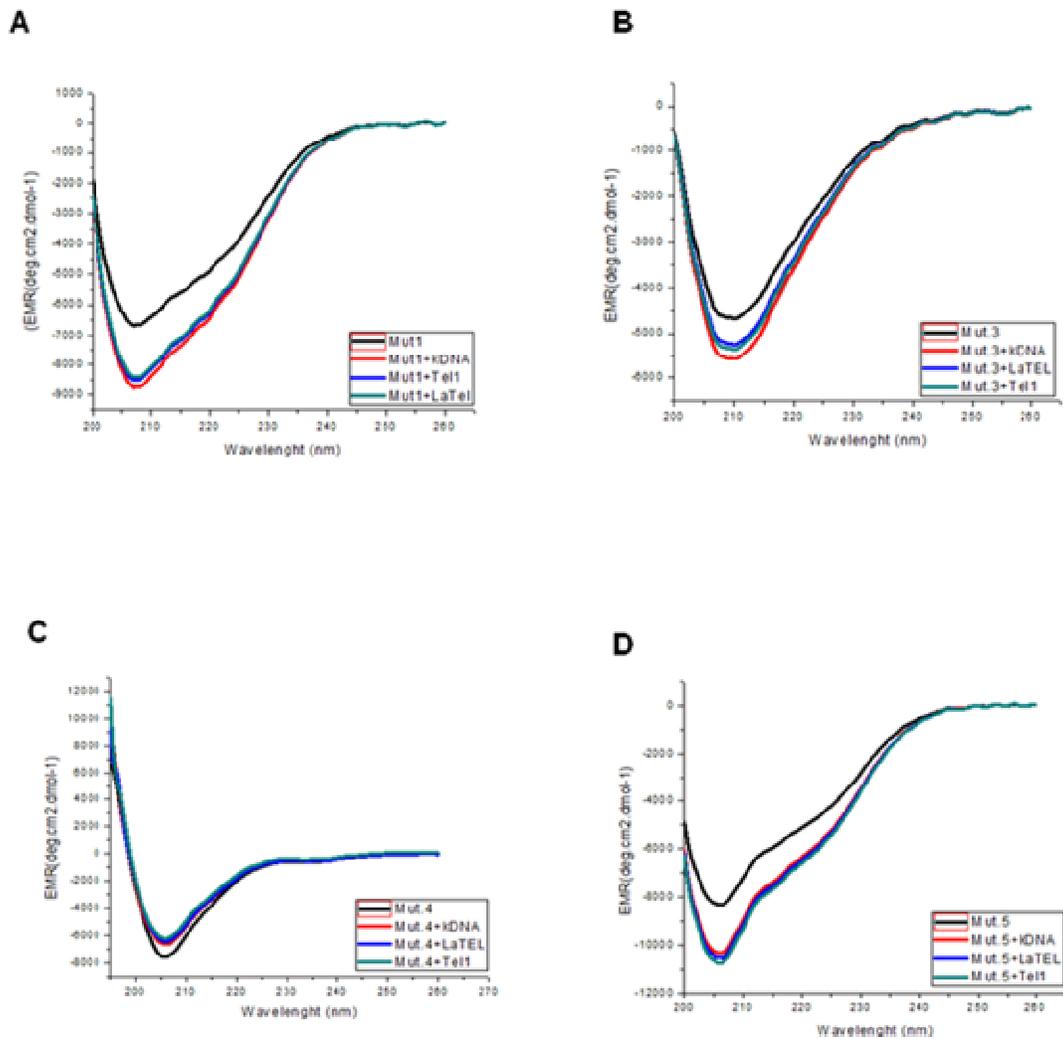
- [13] A. Bateman, L.Coin, R. Durbin, R. Finn, V. Hollich, J. Griffiths, A. Khanna , M. Marshall , S. Moxon, E.L. Sonnhammer, D.J. Studholme, C. Yeats, S.R. Eddy, *Nucleic Acids Research* 32 (2004) 138-141.
- [14] J.Boulé, V. Zakian, *Nucleic Acids Research* 34 (2006) 4147-53.
- [15] L.Y. Chen, Y. Zhang, Q. Zhang, H. Li, Z. Luo, H. Fang, S.H. Kim, L.Qin, P. Yotnda, J. Xu, B.P. Tu, Y. Bai, Z. Songyang, *Molecular Cell* 6 (2012) 28:47.

## Supplementary Figures





**Supplementary Fig. 1. Far UV-CD spectra of full length LaRbp38 and its truncated mutants.** A) full length LaRbp38 in the apo form. B) Mut1 in the apo form. C) Mut2 in the apo form. D) Mut3 in the apo form. E) Mut4 in the apo form. F) Mut5 in the apo form. G) Mut6 in the apo form.



**Supplementary Fig. 2.** Far UV-CD spectra indicated that DNA binding does not alter the secondary structure of some LaRbp38 truncated mutants. Mut1 (A), Mut3 (B), Mut4 (C) and Mut5 (D) in the apo form (black) and in the presence of different types of DNA: kDNA (red), LaTel (blue) and Tel1 (green).

**Suppl. Table 1****Table 1. Primers used for PCR amplification of *LaRBP38* and Mut1-Mut6.**

<b>Primers</b>	<b>Genes</b>	<b>Expected size (bp)</b>
5' CAT ATG CTC CGT CGC GTG 3' 3' CTC GAG CTA CTG AAT GAG 5'	Full length LaRbp38	1,047
5' CAT ATG CTC CGT CGC GTG 3' 3' CTC GAG CTA CTG CAG ATT CTC 5'	Mut1	416
5' CAT ATG GAG GCG CCG AAG 3' 3' CTC GAG CTA CGT TGT CGC CTC 5'	Mut2	428
5' CAT ATG CAG TAC CCC GTT 3' 3' CTC GAG CTA CGG GAA CTT CCT 5'	Mut3	336
5' CAT ATG GGC GAC CGT CAC 3' 3' CTC GAG CTA CTG AAT GAG 5'	Mut4	345
5' CAT ATG CTC CGT CGC GTG 3' 3' CTC GAG CTA CGT TGT CGC CTC 5'	Mut5	600
5' CAT ATG GAG GCG CCG AAG 3' 3' CTC GAG CTA CGG GAA CTT CCT 5'	Mut6	576

F, forward and R, reverse.

## 3.2 Capítulo 2

### **A Proteína LaRbp38 transloca entre o núcleo e cinetoplasto em formas promastigotas de *leishmania amazonensis*.**

#### **Resumo**

Rbp38 é uma proteína exclusivamente expressa em parasitas tripanossomatídeos, incluindo *L. amazonensis*, agente etiológico da leishmaniose tegumentar nas Américas. Em *L. amazonensis*, a LaRbp38, interage *in vivo* e *in vitro* com DNAs ricos em GT ( kDNA, sfDNA, dfDNA teloméricos) e apresenta um importante papel na replicação do DNA nuclear e kDNA. LaRbp38 também foi descrita como apresentando 70% de identidade com a proteína Tc38 de *Trypanosoma cruzi*, a qual foi isolada de extratos nucleares, embora posteriormente evidências mostram que se trata de uma proteína mitocondrial expressa em todas as formas de desenvolvimento do parasita. Em *Trypanosoma brucei*, quando a TbRbp38 fusionada a GFP é superexpressa, a proteína apresenta localização exclusivamente mitocondrial. Entretanto os resultados do nosso grupo são conflitantes com os acima descritos e neste artigo mostramos evidências de que pelo menos em *L. amazonensis*, LaRbp38 pode ser encontrada tanto no núcleo quanto no cinetoplasto. Ensaio com culturas de parasitas sincronizadas com hidróxi-uréia mostram que a localização subcelular de LaRbp38 é ciclo-dependente e aumentada no final da fase S. Além disso, a proteína se acumula preferencialmente no núcleo quando os parasitas são expostos a agentes genotóxicos tais com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e radiação por luz U.V., sugerindo que a translocação do núcleo para o cinetoplasto e vice-versa pode ser afetada por danos causados no DNA. Sabia-se previamente que LaRbp38 apresentava um sinal de localização mitocondrial (MLS) na região N-terminal, então para entendermos como LaRbp38 transloca-se para o núcleo, realizamos diferentes análises *in silico* em busca de um possível sinal de localização nuclear (NLS). Nossos resultados mostraram que LaRbp38 apresenta um possível NLS não clássico em sua região C-terminal, o qual compartilha similaridade de sequência com o NLS encontrado em ORC1 de *L. donovani*. Ensaio de interação proteína-proteína na ausência e presença de competidores específicos mostram que a LaRbp38 interage com a importina  $\alpha$ , utilizando este possível NLS. Importina  $\alpha$  é uma proteína que está envolvida com o transporte de proteínas ao núcleo via NLSs. Estes resultados fornecem uma forte evidência de que a LaRbp38 pode translocar entre o núcleo e cinetoplasto via um NLS não clássico, devido sua interação com a importina  $\alpha$ . Esses resultados são de grande importância e reforçam nossos resultados anteriores, mostrando que Rbp38 pode desempenhar papéis relacionados ao metabolismo de DNA no núcleo e no cinetoplasto em *Leishmania amazonensis*.

#### **Abstract**

### **The protein LaRbp38 translocates between the nucleus and the kinetoplast in**

#### ***Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes**

Rbp38 is a protein exclusively expressed in trypanosomatid parasites, including *L. amazonensis*, the etiologic agent of Tegumentar leishmaniasis in the Americas. In *L. amazonensis*, Rbp38 also called LaRbp38, interacts *in vitro* and *in vivo* with GT-rich DNAs (e.g. kDNA, ssDNA and dsDNA telomeric sequences) and plays an important role in kDNA and nuclear DNA replication. LaRbp38 was also described as having 70% identity with Tc38, a *Trypanosoma cruzi* protein, which was isolated from nuclear extracts, although it has been described as a mitochondrial protein expressed

in all developmental forms of the parasite. In *Trypanosoma brucei*, the overexpression of TbRbp38 fused to GFP showed that the protein has also a exclusive mitochondrial localization. Since the results of our group are conflitant with the above, in this article we show evidences that at least in *L. amazonensis*, LaRbp38 can be found both in the nucleus and in the kinetoplast. Western blot analysis using different *L. amazonensis* extracts and conventional and confocal immunofluorescence showed that LaRbp38 is present in both organelles, although it is more abundant in kinetoplast. By using HU-synchronized parasites we confirmed that the subcellular localization of Larbp38 is cell cycle-dependent. In addition, the protein show a preference to concentrate in the nucleus of the parasite when they are exposed to genotoxic agents such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and U.V. irradiation, suggesting that the translocation between nucleus and kinetoplast can be affected by DNA damage. it was previously known that LaRbp38 bear a N-terminal mitochondrial localization signal, thus, in order to understand how LaRbp38 can translocate to the nucleus, we did in silico analysis to search for a putative nuclear localization signal (NLS) in the protein. Our results show that LaRbp38 bears a putative non-classical NLS in the C-terminus that shares similarities with the NLS found in *L. donovani* ORC1. Protein-protein interaction assays done between LaRbp38 and importin  $\alpha$ , a protein related to nuclear transport by NLS, confirmed the existence of a NLS in LaRbp38. These results provide strong evidences showing that LaRbp38 can translocates between the nucleus and the kinetoplast via a a non-classical NLS, through its interaction with importin  $\alpha$ . The importance of these findings reinforce our previous results showing that in Leishmania, Rbp38 play roles in DNA metabolism in both the nucleus and in the kinetoplast.

### **1.0 Introdução**

Rbp38 é uma proteína codificada por um gene nuclear, e é exclusiva de protozoários da família Trypanosomatidae. A primeira descrição sobre a proteína Rbp38 mostra que em *L. tarantolae* e em *T. brucei*, ela provavelmente funciona como ligante e estabilizadora de RNA simples e dupla fita nas mitocôndrias dos parasitas, embora em sua sequência primária e por predição *in silico*, ela não apresente nenhum domínio reconhecido de ligação a RNA (Sbicego et al., 2003). Posteriormente, Rbp38 foi isolada a partir de extratos nucleares de formas promastigotas de *L. amazonensis*, em coluna cromatográfica de afinidade a DNA telomérico e identificada por sequenciamento de novo usando espectrometria de massa, juntamente com as proteínas DNA polimerase alfa e LaRPA-1 (Fernández et al., 2004). Rbp38 de *L. amazonensis* (LaRbp38) é capaz de interagir *in vitro* com o DNA telomérico simples fita rico em G, e com a sequência de RNA cognata a essa fita telomérica (Fernandez et al., 2004). Em trabalho recente em nosso laboratório, foi possível mostrar que LaRbp38 interage *in vivo* com DNA telomérico na forma de dupla fita e na forma de simples fita, DNA microsatélite rico em GT e com kDNA (Lira et al., 2007). LaRbp38 também foi descrita

como apresentando 70% de identidade a uma proteína de *Trypanosoma cruzi*, denominada de Tc38, que primeiramente foi isolada de extratos nucleares do parasita e mostrou atividade de interação com sequências poli [dT-dG] presentes em regiões intergênicas de *T. cruzi*. Posteriormente, Tc38 foi descrita como uma proteína exclusivamente mitocondrial para todas as formas de desenvolvimento deste parasita (Duhagon et al., 2003). Experimentos de super-expressão da proteína fusionada a GFP, mostraram que a Rbp38 de *T. brucei* também tem localização mitocondrial, pois em ensaios de super-expressão nenhuma proteína foi detectada no núcleo desses parasita (Liu et al., 2006). Baseado nesses resultados e em outros do nosso grupo, resolvemos realizar diferentes ensaios para tentar determinar a localização subcelular de Rbp38 de *Leishmania*, onde pudemos mostrar através de *Western blotting* usando diferentes extratos de *L. amazonensis* (total, núcleo e mitocondrial), e microscopia de imunofluorescência convencional e confocal que LaRbp38 está presente tanto no núcleo quanto no cinetoplasto de *L. amazonensis*, sendo que esta encontra-se mais abundante no cinetoplasto. Ensaios com parasitas sincronizados com hidróxi-uréia confirmaram a localização subcelular de LaRbp38 e mostrou que essa localização é ciclo-dependente. Além de que a proteína mostra acúmulo preferencialmente no núcleo quando os parasitas são expostos a agentes genotóxicos tais com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e radiação por luz U.V., sugerindo que ela pode estar desempenhando diferentes funções nos diferentes compartimento subcelular em resposta a danos no DNA. Um outro resultado que nos deu mais um indício da translocação subcelular de LaRbp38, foi a descoberta de um possível sinal de localização nuclear (NLS) do tipo não clássico, na região C-terminal da proteína. A existência deste sinal foi prevista utilizando-se um algoritmo desenvolvido pelo grupo do Prof. Bostjan Kobe (Universidade de Queensland, Austrália), e comparando-se a sequência primária de aminoácidos de LaRbp38 com a da proteína ORC1 de *L. donovani*, a qual também apresenta um sinal de localização nuclear (NLS) do tipo não clássico na região C-terminal. Ambas as análises culminaram em um resultado comum, sugerindo que a LaRbp38 compartilha com a ORC1 similaridade de sequência entre estes NLS putativos. Baseado

nesses achados também foram realizados ensaios de interação proteína-proteína, onde foi possível determinar a interação entre LaRbp38 e a proteína importina  $\alpha$ , uma proteína que está diretamente ligada ao transporte de proteínas ao núcleo via NLS. Juntos, estes resultados sugerem que a proteína LaRbp38 é capaz de se translocar nos diferentes compartimentos e que seu transporte para o núcleo é provavelmente realizado por um NLS não clássico, porém através de uma via denominada via-clássica, que utiliza interação com a importina  $\alpha$ . Com esses resultados podemos sugerir que Rbp38 pode desempenhar diferentes funções relacionadas ao metabolismo de DNA tanto no núcleo quanto no cinetoplasto em *leishmania amazonensis*.

## **2.0 Materiais e métodos**

### **2.1 Cultura de parasitas**

Formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa MHOM/BR/73/M2269, foram cultivadas em fase exponencial a 27°C em meio “199” (Cultilab) pH 6,5, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e 1X solução de antibióticos e antimicótico (Life Technologies, Gibco-BRL).

### **2.2 Obtenção de extratos proteicos de formas promastigotas de *L. amazonensis***

Extratos totais enriquecidos com proteínas nucleares foram preparados de acordo com Fragaki et al., (2003) a partir de culturas de formas promastigotas, em fase mid log de crescimento contendo aproximadamente  $1.0 \times 10^9$  células. Extratos das frações mitocondriais foram obtidos através do Kit Mitochondrial Fractionation (Active Mottif), conforme instruções do fabricante. Para os extratos totais, formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* na concentração de  $1 \times 10^8$  células, foram lavadas com 1X PBS e rompidas utilizando-se Tampão RIPA (150mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS) em volume de 200 $\mu$ l de tampão RIPA + as células + 10U de DNase (GE Healthcare ) + 1 $\mu$ l *cocktail* de inibidores de proteases (Calbiochem). O extrato parasitário foi incubado no gelo por 15 min. e em seguida misturado fortemente com auxílio de vortex durante 10 segundos. Este procedimento foi repetido 5 vezes. Por fim, o extrato foi centrifugado a 10.000 rpm durante 8 min. O sobrenadante contendo extrato protéico parasitário total foi recuperado e estocado no freezer a -20°C.

### **2.3 Sincronização da cultura de parasitas para análise da expressão de LaRbp38 durante o ciclo celular**

O procedimento usado para sincronizar cultura exponenciais de formas promastigotas de *L. amazonensis* foi padronizado por da Silva e colaboradores (da Silva et al., submetido). Culturas de três dias foram inoculadas com hidróxiureia (HU) para concentração final de 400 µg/ml, ficando incubadas de 12 a 16 horas. Após o tratamento, os parasitas foram centrifugados a 2500 rpm por 15 minutos e descartado o meio com HU. Após os parasitas foram ressuspensos no dobro do volume original de meio de cultura fresco. Amostras contendo mínimo de  $2 \times 10^6$  parasitas foram coletadas ao longo dos tempos estudados. As células foram centrifugadas (10.000 rpm por 1 minuto), o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µl de PBS 1x. Após nova centrifugação (10.000 rpm por 1 minuto) e descarte do sobrenadante as células foram fixadas utilizando 100 µl de formaldeído 1% por 5 minutos à temperatura ambiente. O formaldeído foi removido após centrifugação (10.000 rpm por 1 minuto) e as células foram lavadas com 200 µl de PBS 1x seguido de nova centrifugação. Após a etapa de fixação foram procedidas as mesmas etapas do protocolo de imunofluorescência que será descrito abaixo.

### **2.4 Determinação da localização subcelular de LaRbp38 em formas promastigotas de *L. amazonensis*.**

Para este ensaio utilizou-se modificações do protocolo descrito em da Silva et al., (2010). Para os ensaios de imunofluorescência, as lâminas foram previamente lavadas e tratadas com 0,1% de polilisina (Poly-L-lysine hydrobromide- Sigma).  $1 \times 10^6$  parasitas na forma promastigota (*L. amazonensis*) foram centrifugados a 5.000 rpm, durante 5 min., descartado o sobrenadante, o *pellet* foi ressuspenso em 1 ml de PBS 1 X gelado e novamente centrifugado. Logo após os parasitas foram fixados em 400µl de fomalina 1% e depositados na lâmina tratada com polilisina, permanecendo aí por 5 minutos. Em seguida foram lavados 2 vezes com PBS 1X. Os parasitas foram permeabilizados durante 5 min. a temperatura ambiente na presença de 10µl de 0,1% Triton

X-100 (Calbiochem) e em seguida lavados com PBS 1 X. Logo após, os parasitas foram incubados com o soro anti-LaRbp38 na diluição 1:1000, por 2 horas na geladeira. O soro foi previamente diluído em uma solução de PBS com 4% de BSA. Após a incubação a lâmina foi lavada cuidadosamente com PBS 1X e os parasitas foram então incubados por 2 horas na geladeira e na ausência de luz, com o anticorpo secundário anti-*Rabbit* IgG Alexa Fluor 555 na diluição 1:3000 na presença de 1X PBS + 4% BSA. Em seguida as lâminas foram lavadas com PBS 1X, secas a temperatura ambiente e fechadas com 3 µl de Vectashield+DAPI (Vector) e lacradas com lamínula e esmalte. As imagens foram analisadas por microscopia de fluorescência (Nikon Exclipse 80i), usando aumento de 100X e analisadas através do programa Nis-Elements BR.

## **2.5 Tratamento de formas promastigotas de *L. amazonensis* com agentes indutores de danos: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e luz U.V.**

### **2.5.1 Obtenção do IC<sub>50</sub> para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e luz U.V usando o teste MTT**

Para determinar a dose ideal de peróxido de hidrogênio, que poderia induzir danos oxidativos e o tempo de irradiação com luz U.V ao DNA de *L.amazonensis* sem ser letal ao parasita, foi realizado o teste de IC<sub>50</sub> usando MTT. Este é um teste colorimétrico para a medição da atividade de enzimas que reduzem o corante MTT para corantes formazan, resultando em uma coloração roxa, o que permite avaliar a viabilidade e a proliferação de células, já que a redução do corante se dá na mitocôndria de células em proliferação.

Para tal, culturas de forma promastigota de *L.amazonensis* foram tratadas com diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e também por diferentes tempo de irradiação de luz U.V e retiradas amostras de hora em hora, contendo 1.10<sup>6</sup> parasitas. As amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 5 min. para a retirada do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (no caso da Luz U.V os parasitas não precisaram trocar de meio de cultura) após, foram lavados 2 X com PBS 1X e incubados por 1 hora em uma solução de 0,3 mg de diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma). Após o tempo de incubação os parasitas foram lavados 1 X em PBS 1X e acrescentado 1 ml de álcool 100%, os parasitas foram então vortexados e

foi realizada a leitura de comprimento de onda de 540 nm em leitor de placa de ELISA. Em paralelo com o ensaio do MTT, foram retiradas amostras de hora em hora e feitas as contagens do número de parasitas em câmara de Neubauer.

### **2.5.2 Ensaio de TUNEL para detecção de danos ao DNA de parasitas tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e luz U.V**

O ensaio de TUNEL foi realizado com cultura de *L. amazonensis* em fase exponencial, para cada ensaio foi usado  $1.10^7$  parasitas, utilizando-se o Kit Dead end fluorimetric tunel system (Promega), onde foram seguidas todas as instruções dadas pelo fabricante.

### **2.5.3. Tratamento dos parasitas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

O estresse oxidativo é uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a sua desintoxicação através de sistemas biológicos que as removem ou reparam os danos por elas causados. Todos os organismos vivos possuem um ambiente intracelular de natureza redutora, existindo um equilíbrio entre as formas oxidada e reduzida de moléculas como o NADH, equilíbrio esse mantido por enzimas à custa de energia metabólica. Perturbações neste equilíbrio, podem provocar a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e radicais livres que danificam todos os componentes celulares, incluindo proteínas, lípidos e o DNA (Schafer e Buettner, 2001). Para descobrir se a proteína LaRbp38 está envolvida com a resposta a danos no DNA causados por estresse oxidativo, promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com doses sub-letais de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2mM). Após a recuperação dos parasitas por incubação em meio de cultura sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, verificamos a expressão de LaRbp38, através da produção de extratos contendo  $1.10^7$  parasitas e posterior revelação desses por *Western blotting*, usando soro anti-LaRbp38. Para estes experimentos também foram retiradas alíquotas com a mesma quantidade de parasitas nos mesmos intervalos de tempo, de culturas não tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que foram usadas como controle.

#### **2.5.4 Irradiação dos parasitas com luz ultravioleta**

Para verificar a possível participação de LaRbp38 mediante danos ao DNA, culturas de *L.amazonensis* foram irradiadas com 2.000J de Luz U.V por 1 minuto. A radiação U.V é responsável por causar diversos tipos de lesões nas células e consequentemente danos estruturais na molécula de DNA, podendo alterar drasticamente os processos de transcrição gênica (Symington L.S, 2002) . Para tal, formas promastigotas de *L.amazonensis* em fase *mid log* de crescimento foram expostos por 1 minuto a doses controladas de luz U.V. Os parasitas foram expostos a doses iniciais de 2.000 J/m<sup>2</sup> (WU, X. et al., 2005), utilizando-se o aparelho Ultra Violet crosslinker (Ultralum). O ensaio foi realizado expondo-se os parasitas em meio de cultura dentro de placas de petri . Em seguida, os parasitas foram colocados em frascos de cultura e embrulhados em papel de alumínio, de forma a impedir a passagem de luz (impedindo possível reparo direto por ação de uma fotoliase símile desconhecida) e então incubadas por diferentes períodos de tempo( 5, 15, 30 min., 1 e 2 horas). Após os tempos de incubação, foram preparados extratos contendo  $1 \cdot 10^7$  parasitas. Os extratos do tempo de exposição a luz U.V e recuperação dos parasitas, bem como os controles do experimento, foram submetidos a *Western blotting* e revelados com soro anti-LaRbp38, e de outras proteínas, onde foram analisados os níveis de sua expressão.

## **2.6 Ensaio de interação proteína-proteína**

### **2.6.1. Imunoprecipitação**

Os ensaios de imunoprecipitação foram realizados utilizando-se soro anti-LaRbp38 produzido em coelho (Lira et al., 2007) e soro anti-LaTRF e o Kit Seize X Protein A Immunoprecipitation (Pierce Thermo Scientific), seguindo as especificações do fabricante. Esse kit oferece vantagem de reter os anticorpos à resina contendo a proteína A, sendo assim, permite a eluição da proteína de interesse sem os contaminantes eventuais como as cadeias leve e pesada dos anticorpos. O procedimento é

realizado em uma coluna (Handee™ spin column). Os imunoprecipitados foram eluídos por centrifugação e posteriormente analisados por *Western blotting* com soros específicos .

### **2.6.2 Ensaio *Pull-down* com uso de extrato nuclear do parasita como fonte de proteínas interatoras.**

Extratos proteicos nucleares obtidos de formas promastigotas do parasitas foram utilizados como fonte para possíveis proteínas parceiras da Importina  $\alpha$ . Para o experimento foram incubados previamente 100  $\mu$ g de extrato de núcleo, com 50  $\mu$ g de proteína importina  $\alpha$  recombinante, expressa contendo uma cauda *6x His tag*, conforme protocolo descrito por Takeda, et al., por 12 horas a 4 °C. Após a primeira incubação, o possível complexo formado pela importina  $\alpha$  foi incubado por 4 horas a 4 °C com 100  $\mu$ l de uma resina de níquel (*NiNTA Superflow* – Qiagen). Após lavagens em tampão para *pull-down* (50 mM Tris-HCL pH 8,0, 1% NP40 e 1% inibidor de protease), foi adicionado *Loading buffer* 5X a resina de níquel contendo o possível complexo formado por importina  $\alpha$  e LaRbp38 e esta foi estocada a -20 °C para análise posterior em gel SDS-PAGE e *Western blot*.

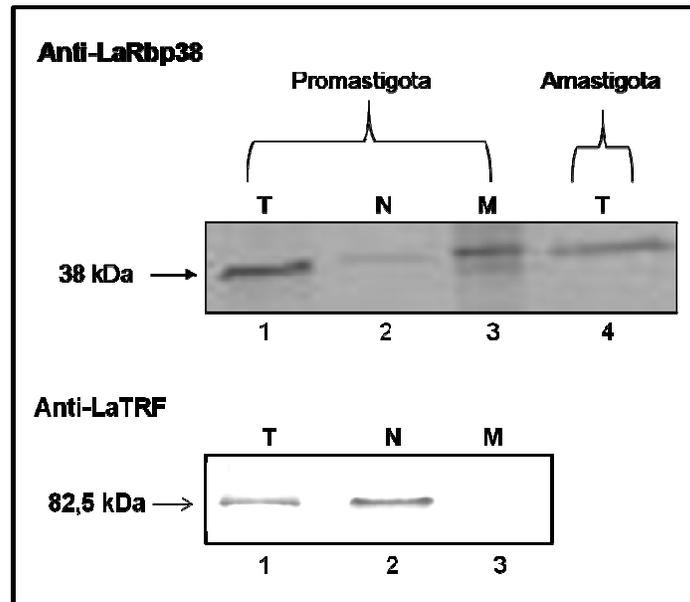
## **3.0 Resultados e discussão**

### **3.1 LaRbp38 é expressa nos diferentes compartimentos subcelulares nas diferentes fases de desenvolvimento do parasita.**

Para determinar a localização subcelular de LaRbp38, foram preparados diferentes extratos a partir de parasitas *L.amazonensis* tais como extratos totais, extratos de núcleo e extratos mitocondriais de formas promastigotas, e extrato total a partir de formas amastigotas, conforme descrito em materiais e métodos. Esses extratos foram fracionados em gel SDS-PAGE 12%, transferidos para uma membrana de nitrocelulose e as proteínas foram reveladas por *Western blotting*, utilizando soro anti-LaRbp38 como anticorpo primário. Como mostrado na Fig. 1, pudemos observar a presença de LaRbp38 em todos os extratos testados, confirmando que: 1) a

proteína é expressa nas duas principais fases de desenvolvimento do parasita (promastigota e amastigota) e que 2) é possível que, estando presente em extratos de núcleo e mitocôndrias, ela cumpra funções em ambos os compartimentos celulares.

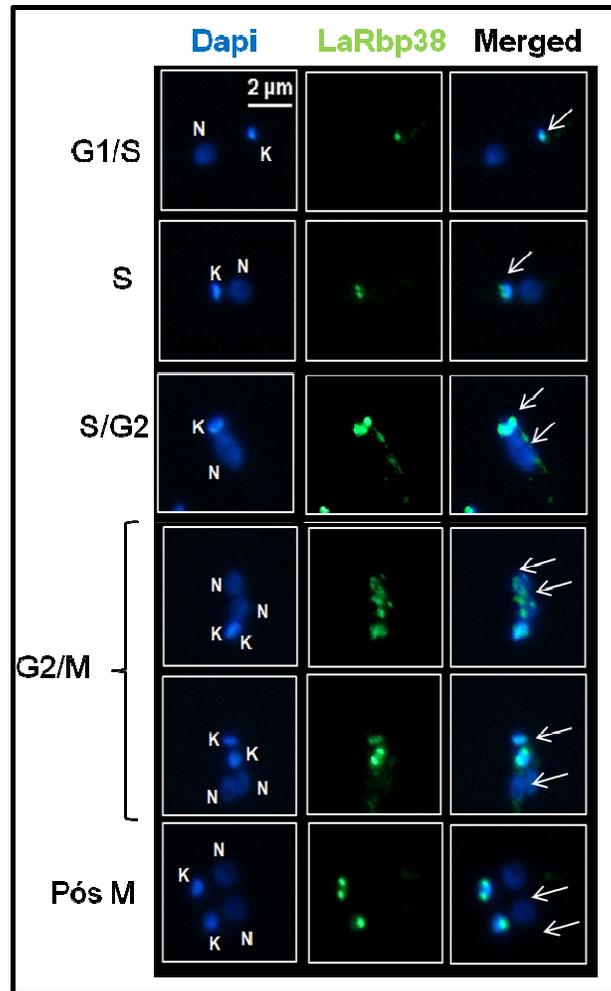
Resultados semelhantes aos nossos foram apresentados por Duhagon et al., (2009) em relação a expressão da proteína homóloga a LaRbp38 em *T. cruzi*, denominada Tc38. Os autores mostraram por ensaios bioquímicos que a proteína Tc38 aparece em ambos os compartimentos subcelulares: núcleo e cinetoplasto, embora os autores acreditem que essa localização nuclear seja devido a alguma contaminação nos extratos por eles preparados, já que no núcleo a proteína é menos abundante que no cinetoplasto.



**Fig.1: Western blotting** utilizando soro anti-LaRbp38 mostrando a localização de LaRbp38 nos diferentes compartimentos subcelulares. Extrato total (T), extrato de núcleo(N) e extrato de mitocôndria (M) obtidos a partir de formas promastigotas de *L.amazonensis* e por último extrato total (T) de formas amastigotas de *L.amazonensis* revelados com soro anti-LaRbp38 e com soro anti-LaTRF, usado como controle, uma vez que esta é uma proteína exclusivamente nuclear.

### **3.2 Ensaio de imunofluorescência indireta mostram a presença da LaRbp38 no núcleo e no cinetoplasto de *L. amazonensis* nas diferentes fases do ciclo celular.**

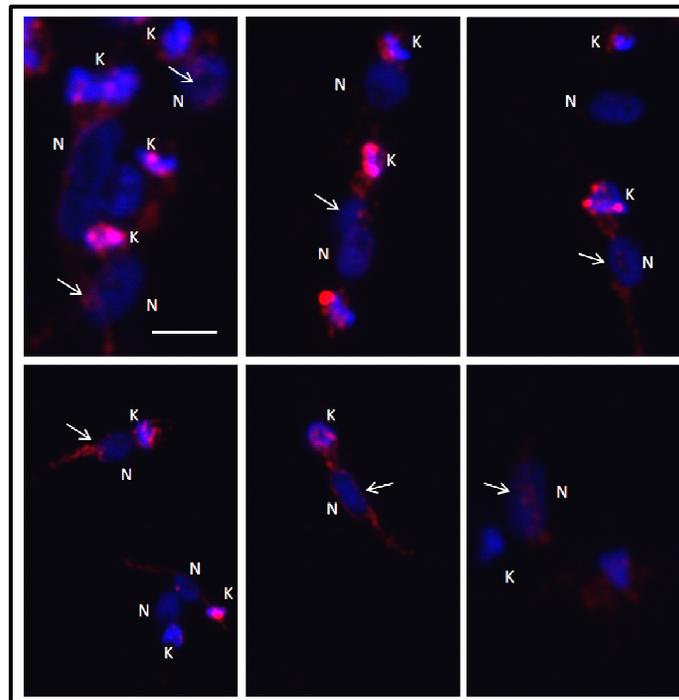
Para confirmar a localização subcelular de LaRbp38, realizamos ensaio de imunofluorescência indireta utilizando formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* cultivadas em fase exponencial de crescimento, e também com células sincronizadas com hidróxi-uréia (da Silva, M.S et al., submetido) ( Fig.2). Os parasitas foram incubados com soro anti-LaRbp38 como anticorpo primário e revelados com anti-IgG de coelho marcado com Alexa Flúor 488 (verde). Os resultados obtidos nas imagens mostradas na Fig.2, demonstram a presença de LaRbp38 tanto no cinetoplasto, quanto no núcleo dos parasitas (vide sobreposição das imagens). Em parasitas sincronizados, note que de acordo com as diferentes fases do ciclo celular a proteína LaRbp38 está presente nas diferentes organelas dependendo da fase do ciclo celular, porém a maioria dos parasitas apresentam a proteína no cinetoplasto geralmente com disposição antipodal, como anteriormente mostrado por Liu et al., (2006) para TbRbp38 e por Duhagon (2009) para Tc38. Estes autores observaram que as proteínas ortólogas de *T. cruzi* e *T. brucei*, apresentam-se somente no cinetoplasto e com distribuição nos dois pólos da organela (localização antipodal) sugerindo que elas possivelmente participam da replicação de minicírculos, uma vez que esta é a localização da maquinaria de replicação do DNA de cinetoplasto (Simpson et al., 1987; Degraeve et al., 1994). De acordo com Duhagon et al., 2009, em *T. cruzi* a localização preferencialmente mitocondrial e polarizada nas células nas diferentes fases de desenvolvimento do parasita, sugere a função de replicação exercida pela proteína, onde ela apresenta-se polarizada no cinetoplasto em formas promastigotas do parasita. É necessário salientar que esta é a primeira vez que se mostra a proteína LaRbp38 em ambos compartimentos (núcleo e cinetoplasto), apesar da sua preferencial localização no cinetoplasto. Nossos resultados mostraram que ela transita pelos diferentes compartimentos e que esta translocação parece ser dependente da fase do ciclo celular.



**Fig.2: Localização subcelular de LaRbp38 mostrando o trânsito da proteína do cinetoplasto para o núcleo em formas promastigotas de *L. amazonensis*.** Parasitas sincronizados com hidróxi-uréia mostram a presença da proteína LaRbp38 no cinetoplasto (K) em posição polarizada ou antipodal e distribuída em diferentes pontos no núcleo (N) de acordo com as diferentes fases do ciclo celular. A presença da proteína foi detectada por imunofluorescência usando anti-LaRbp38, revelado com alexa fluor verde (488). DAPI marcando núcleo e o cinetoplasto. Sobreposição das imagens (Merged). As imagens foram adquiridas em microscópio Nikon Eclipse 80i, em objetiva de 100 X, capturadas usando programa NIS-Elements AR 3-10.

Ensaio de Imunofluorescência indireta bem como análise das imagens por microscopia de fluorescência e confocal foram utilizados como mais uma ferramenta para comprovar a localização subcelular de LaRbp38 nos diferentes compartimentos subcelulares. Estes ensaios foram realizados com parasitas obtidos de cultura não sincronizada, e as imagens de confocal foram analisadas em colaboração com o Prof. Hernandez Carvalho (UNICAMP). Nas imagens mostradas na figura 3,

podemos visualizar a LaRbp38 no núcleo (N) e no cinetoplasto (K) de formas promastigotas do parasita. As imagens obtidas permitiram também visualizar o trânsito da proteína pelos diferentes compartimentos celulares. Na Fig. 3 temos amostragens representativas de imagens submetidas a diversos cortes em Z, que comprovam os resultados anteriores obtidos por microscopia de fluorescência em que realmente a proteína pode ser encontrada nas duas organelas, não se tratando portanto de um artefato.



**Fig. 3: Microscopia confocal mostra a localização subcelular de LaRbp38.** Ensaio de imunofluorescência foi realizado com soro anti-LaRbp38 e analisado a partir de microscopia confocal. Células coradas com DAPI onde N representa o núcleo e K o cinetoplasto dos parasitas. As setas indicam a localização nuclear de LaRbp38, mostrando que ela está realmente presente em ambos os compartimentos celulares. As imagens foram adquiridas em microscópio Zeiss, em objetiva de 40 X, capturadas usando programa Laser Scanning Microscopes. Resultados representativos de cortes em Z.

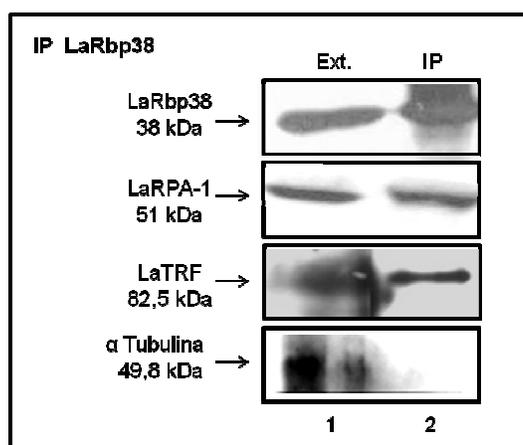
### 3.3 LaRbp38 imunoprecipita com proteínas sabidamente nucleares

Uma outra evidência da possível localização nuclear da LaRbp38 é a de que ela imunoprecipita com proteínas teloméricas sabidamente nucleares. No ensaio aqui apresentado, eluatos da imunoprecipitação de extrato de núcleo do parasita com o soro anti-LaRbp38, foram submetidos a

*Western blotting* e revelados com soros imunes contra proteínas teloméricas previamente identificadas por nosso grupo, tais como: anti-LaRPA-1, e anti-LaTRF.

Os resultados mostraram que as três proteínas (LaRbp38, LaTRF e LaRPA-1) são eluídas juntas na imunoprecipitação ( Fig.4), sugerindo que elas fazem parte de um mesmo complexo protéico no núcleo dos parasitas , e que a LaRbp38 não co-imunoprecipita com a alfa-tubulina, usada como controle no experimento. Além disso, estes resultados podem ser um outro indício da localização nuclear de LaRbp38 já que tanto LaRPA-1 quanto LaTRF são proteínas exclusivamente nucleares.

Acreditamos que as proteínas LaRbp38, LaRPA-1 e LaTRF possam realmente fazer parte de um complexo, onde juntas cumpram um papel que pode ser essencial para a manutenção do parasita. Esses resultados confirmam em parte os achados de Fernandez et al., 2004 , onde as proteínas LaRbp38 e LaRPA-1 foram isoladas e identificadas, por espectrometria de massa e seqüenciamento *de novo*, juntas em extratos nucleares purificados em coluna de afinidade ao DNA telomérico. Ambas as proteínas foram previamente identificadas como componentes protéicos de dois complexos proteína-DNA telomérico .



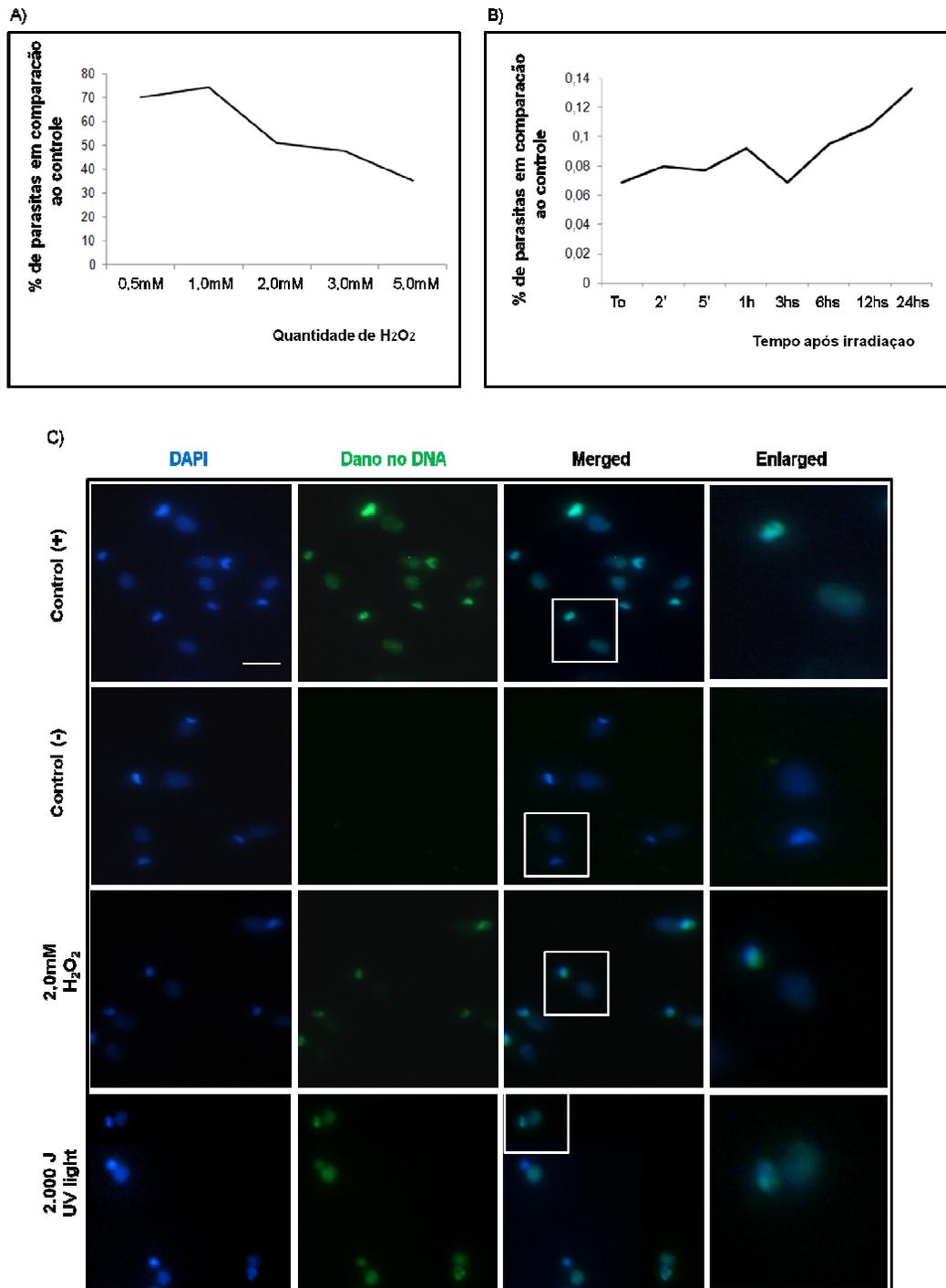
**Fig.4: LaRbp38 co-imunoprecipita com as proteínas nucleares LaRPA-1 e LaTRF.** Imunoprecipitação realizada com soro anti-LaRbp38 e extrato nuclear de *L.amazonensis*, revelados por *Western blotting* com soro anti-LaRbp38, anti-LaRPA1, anti-LaTRF e anti-  $\alpha$  tubulina como controle de *loading*. Ext (linha1) representa o extrato nuclear utilizado no experimento, IP (linha 2) representa o eluato da imunoprecipitação contendo os complexos proteicos.

### **3.4 Alterações na localização subcelular de LaRbp38 sob condições de estresse oxidativo provocado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e radiação por luz U.V.**

Primeiramente, foram determinados o IC50 do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a viabilidade de parasitas submetidos a radiação U.V para formas promastigotas de *L. amazonensis* e a extensão do dano provocado no DNA dos parasitas foi posteriormente checado em ensaio de Tunel (Fig.5 A-C) Para isso, parasitas em fase logarítmica de crescimento foram tratados com 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, e 5,0 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 hora a temperatura ambiente e em seguida foi realizado o teste do MTT. De acordo com a fig. 5A, podemos observar que nas condições experimentais utilizadas, o IC50 do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formas promastigotas de *L. amazonensis* é de aproximadamente 2,0 mM, pois nesta concentração obteve-se aproximadamente 50% de parasitas vivos e 50% mortos sendo que doses acima desta reduziram por mais da metade o número de parasitas na cultura. Já para a determinação da viabilidade dos parasitas submetidos a irradiação por luz U.V, parasitas foram irradiados com 2.000 J de luz U.V por 1 minuto e retiradas aliquotas de diferentes tempos após a irradiação. De acordo com a fig. 5B, podemos observar que após 1 hora de exposição, ocorre uma significativa diminuição no número de parasitas, seguida por um aumento após 3 horas. A partir desses resultados pudemos determinar a dose de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de irradiação por luz U.V para a realização dos ensaios que serão apresentados na sequencia.

De modo a verificar se as doses, tanto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quanto de U.V, eram suficientes para causar danos aos parasitas, foi empregada a técnica de TUNEL, que detecta danos endógenos no DNA e tem sido considerada um método simples e adequado para detectar diferentes tipos de quebras no DNA (na forma de simples e de dupla fita). De acordo com as imagens mostradas na Fig.5C, podemos verificar que 2,0 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 2.000 J de luz U.V causam quebras no DNA, quando comparados aos controles positivos (parasitas tratados com DNase I), e ao controle negativo onde o ensaio foi feito com parasitas não tratados com os diferentes agente indutores de danos: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e luz U.V. Nota-se marcação tanto no núcleo quanto no cinetoplasto das células tratadas e que a

marcação é bastante homogênea, o que pode significar que também é homogêneo o tipo de dano provocado pelos diferentes agente indutores de danos no DNA do parasita.



**Fig.5** Determinação do IC50 e ensaio de TUNEL para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e luz U.V para confirmação de danos em *L.amazonensis*. Em **A**, determinação do IC50 para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, onde foram utilizadas as concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em **B**, determinação da viabilidade de parasitas irradiados com 2.000 J de luz U.V por 1 min., após diferentes tempos: 2 e 5 minutos, 1,3,6,12 e 24

horas. C) Ensaio de TUNEL mostrando a presença de danos no DNA de parasitas tratados com 2,0 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 hora e 2.000 J de luz U.V por 1 minuto. Como controle positivo foram usados parasitas tratados com DNase I e como controle negativo parasitas não tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou não irradiados com luz U.V. DAPI, marcando o DNA no núcleo (N) e no cinetoplasto (K) e a sobreposição das imagens (MERGED). As imagens foram obtidas em um Nikon Eclipse 80i em aumento de 100X.

Após verificação do IC50 e a comprovação que tanto o peróxido, quanto a radiação U.V provocam danos no DNA dos parasitas, foram preparados extratos para análise da expressão de LaRbp38 e de outras proteínas envolvidas com resposta a danos oxidativos e possíveis danos causados pela luz U.V, utilizando-se *Western blotting* (Fig 6 A e B). Parasitas tratados também foram submetidos a ensaio de imunofluorescência indireta para verificar se os diferentes agente indutores de danos, poderiam induzir modificações na localização subcelular da LaRbp38.( Fig.7 A e B).

Resolvemos utilizar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para este ensaio, levando em conta seu forte potencial oxidante, e o fato de que durante o ciclo de vida das *Leishmania* spp., os parasitas são expostos à ROS (espécies reativas de oxigênio) gerados por seus próprios processos fisiológicos ou como resultado de reação imune do hospedeiro. Diferentemente da maioria dos eucariotos, *Leishmania* spp. não possuem catalases e peroxidases, enzimas que desempenham um papel na desintoxicação de ROS (Subhankar, D et.al., 2009), assim como em outros tripanosomatídeos a via de detoxicação de peróxidos ocorre via tripanotiona peroxidase. Embora a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada para os ensaios que mostraremos a seguir, seja superior à fisiológica, que se encontra por volta dos 0,2 µM, a elevada sensibilidade às variações na concentração desta molécula, reforça a necessidade dos organismos possuírem mecanismos de eliminação destas espécies químicas (Giorgio et al., 2007), sendo assim, esses organismos precisam de mecanismos de proteção e reparo eficientes para a eliminação destes produtos.

Já os danos genéticos provocados pela radiação U.V, envolvem não somente a absorção de energia direta

pelo DNA, como também a formação de radical HO, que reage com esta biomolécula, podendo gerar modificações mutagênicas. (Guaratini, T et al., 2006). Dentre as consequências causadas pela luz U.V, podemos citar a formação de dímeros de pirimidina que se ocorrerem em uma grande extensão da molécula de DNA podem provocar quebras de DNA tanto na forma de dupla, quanto simples fita, (Cruet-Hennequart, S.S, 2006). A radiação ultravioleta induz efeitos deletérios em todos os organismos vivos, desde os procariontes até os eucariontes superiores. A alta energia e curto comprimento de onda de fótons absorvidos pelas moléculas podem levar à formação de oxigênio singlete ou radicais livres que podem destruir membranas e outros componentes celulares (Rajeshwar e Häder, 2002).

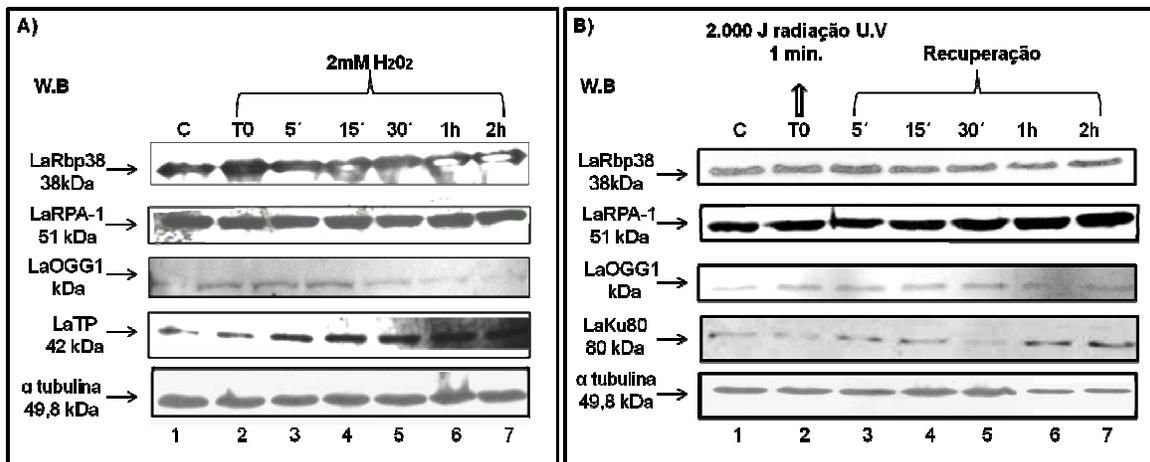
### **3.5 Análise da expressão da LaRbp38 e de outras proteínas envolvidas nos mecanismos de resposta a danos, após o tratamento de culturas com diferentes agentes indutores de danos: químico (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e físico ( Luz U.V)**

Para avaliarmos possíveis alterações na expressão da proteína LaRbp38 em parasitas expostos aos agente genotóxicos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e luz U.V), extratos nucleares de formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes tempos ou irradiadas com 2.000 J de luz U.V, foram analisadas por *Western blotting*, comparativamente a extratos de parasitas não submetidos a esses tratamentos (Fig.6). Pudemos observar neste ensaio que não correu alteração significativa na expressão de LaRbp38, logo após a adição de 2,0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na cultura (T0) (fig.6A linha 2) , quando comparado ao controle (extrato de parasitas não tratados) ( Fig. 6A linha 1) . Os mesmos extratos foram analisados com relação à expressão de outras proteínas, como LaRPA-1 que tem como uma de suas funções, participar de diferentes maquinarias de resposta a danos ao DNA (Longhese et al., 1994, Wold, 1997, Smith et al., 2000, da Silveira, da Silva et al., 2013) . Neste caso também é observado que não correu alteração significativa na sua expressão logo após a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig.6A). Também foram analisadas possíveis alterações na expressão de LaOGG1, uma DNA glicosilase que reconhece especificamente bases modificadas 8-oxoG produzidas durante

o dano oxidativo. OGG1 está diretamente ligada ao reparo por excisão de bases, resultante da exposição a espécies reativas de oxigênio (ROS) (Wang, et.al., 2010). Neste caso, observamos uma diminuição progressiva da expressão da mesma (Fig. 6A, linhas 2-7), o que sugere, que em *Leishmania amazonensis*, esta proteína, ao invés de agir diretamente reconhecendo as bases oxidadas 8-oxoG, durante o reparo, pode estar recrutando outras proteínas que podem ter ação mais direta no dano causado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para confirmar que o parasita é capaz de responder aos danos oxidativos, os extratos de parasitas tratados e não tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram revelados com soro anti-TP (triparedoxina peroxidase), uma proteína envolvida na redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O quando há formação de espécies reativas de oxigênio (Eslami, et.al., 2011). De acordo com a Fig. 6A(linhas 2-7) podemos observar um aumento progressivo da expressão de LaTP, provavelmente causado pelo excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usado no experimento. Isto sugere que diante de concentrações altas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> os parasitas produzem mais TP como forma de acelerar a redução da maior parte do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água evitando desta forma a morte celular.

Para os ensaio de indução de danos por luz U.V, após os devidos tempos de exposição, dos parasitas, foram preparados extratos nucleares contendo  $1.10^7$  parasitas para análise da expressão da proteína LaRbp38, bem como de outras proteínas com funções de reparo como é o caso da LaRPA-1, LaOGG1 e LaKu80,  $\alpha$  tubulina foi utilizada como controle de *loading*. É importante ressaltar que a irradiação de culturas com luz U.V pode provocar diferentes tipos de danos, como produção de bases oxidadas, quebras de simples e dupla fita, formação de dímeros de pirimidina, danos em geral que podem levar a alterações drásticas nos processos de transcrição gênica e replicação de DNA. (Weber, C et.al., 2009) . Os resultados apresentados na Fig.6B(linha 3), mostram um pequeno aumento na expressão da LaRbp38 após 5 minutos de irradiação, voltando a níveis normais logo após (fig.6B, linhas 4-7). Em relação a proteína LaRPa-1 observamos um aumento progressivo após a irradiação. Quando os extratos foram revelados com soro anti-LaOGG1 não observamos nenhuma modificação significativa em sua expressão, diferentemente de LaKu80 que

aumenta progressivamente após a irradiação da cultura, fato esperado já que esta proteína está sabidamente envolvida nos mecanismos de reparo a danos no DNA, como por exemplo de junções não homólogas entre quebras de DNA em dupla fita (Reynolds, et al., 2012). Não sabemos ainda qual(is) tipo(s) de danos a irradiação por luz U.V causou nos parasitas que testamos, porém podemos tomar por base as diferenças nos níveis de expressão da proteína LaRPA-1 para inferir tais danos. LaRPA-1 é uma proteína que em outros eucariotos tem funções descritas tanto nas maquinarias que reparam danos provocados por luz U.V (Cruet-Hennequart S, et.al., 2006), quanto de danos provocados por agentes que causam quebra na dupla fita do DNA (Symington L.S., 2002). Como a LaRbp38 foi encontrada interagindo com LaRPA-1, podemos considerar que ambas possam participar das mesmas maquinarias.



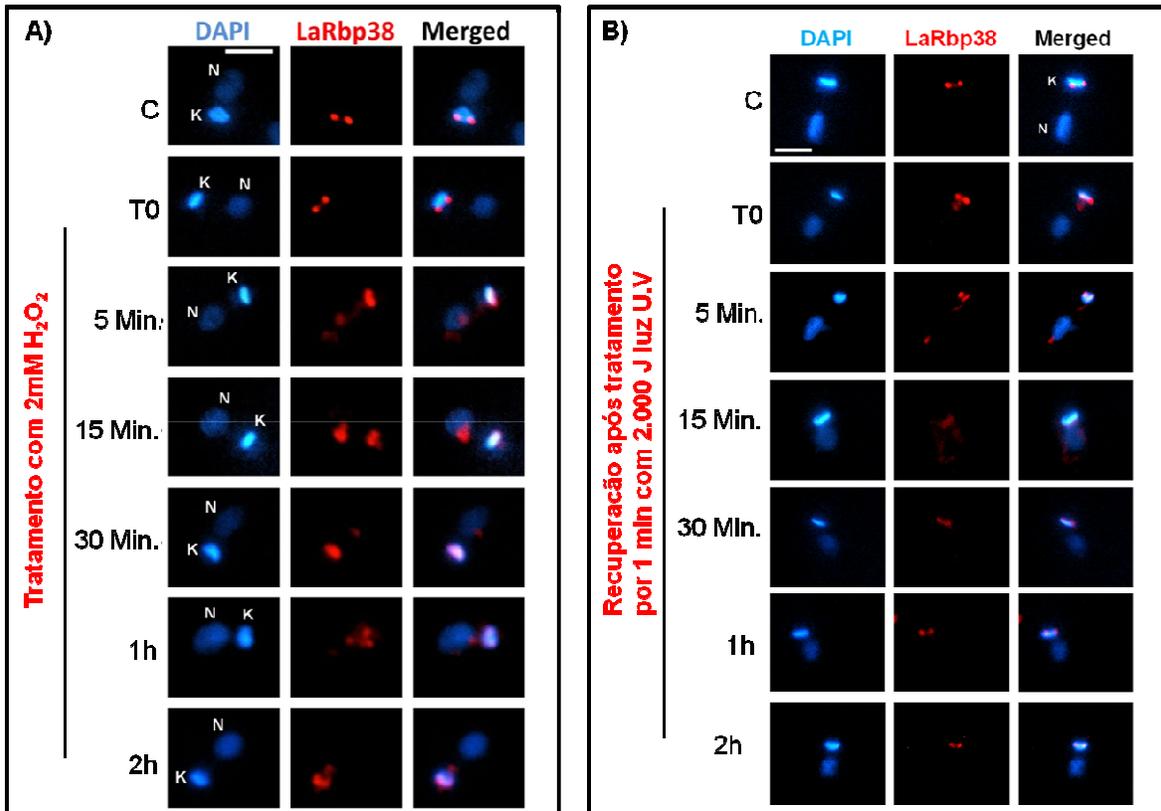
**Fig. 6: Estudo da expressão das proteínas LaRbp38, LaRPA-1, LaOGG1 e LaTP e LaKu80, após diferentes tempos de tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e luz U.V.** Em **A)** Análise por *Western blotting* de extratos de *L.amazonensis* produzidos após diferentes tempos de tratamento de culturas com 2,0 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, revelados com diferentes soros: anti-LaRbp38, anti-LaRPA-1, anti-LaOGG1, anti-LaTP e anti- $\alpha$  tubulina usada como controle de *loading*. Em **B)** *western blotting* realizado a partir de extratos de *L.amazonensis* após irradiação por 1 min. com 2.000 J de luz U.V, revelados com soros: anti-LaRbp38, anti-LaRPA-1, anti-LaOGG1, anti-LaTP e anti- $\alpha$  tubulina usada como controle de *loading*.

### **3.6 LaRbp38 transita pelos diferentes compartimentos subcelulares de *L.amazonensis* após tratamento dos parasitas com diferentes agentes indutores de danos: químico (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e físico (Luz U.V).**

Após o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, amostras de parasitas em diferentes tempos (controle, T0, 5, 15, 30 min, 1 e 2 horas) foram retiradas para realização de ensaios de imunofluorescência usando soro imune anti-LaRbp38. Estes ensaios foram realizados para avaliarmos se durante o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocorriam alterações na localização subcelular da proteína LaRbp38. De acordo com a Fig. 7A, que é uma amostragem representativa dos resultados obtidos, podemos observar que após 5 min. de tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a proteína LaRbp38 passa a ser visualizada em ambos os compartimentos subcelulares (nucleo (N) e cinetoplasto (K)) permanecendo até 1h após. Nos parasitas não tratados, ou controles, a proteína foi predominantemente encontrada no cinetoplasto, mostrando que em *L. amazonensis*, LaRbp38 pode participar da sinalização ou da resposta aos danos oxidativos no DNA nuclear e mitocondrial.

Para avaliar o que estava acontecendo com a proteína no parasita após a irradiação com luz U.V, também foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta utilizando-se parasitas irradiados com 2.000 J de luz U.V. Parasitas não irradiados foram usados como controle. Podemos notar, de acordo com as imagens mostradas na fig.7B que na maioria das células, antes da irradiação, a proteína LaRbp38 se encontra localizada no cinetoplasto. Porém, após a irradiação a proteína pode também ser visualizada no núcleo dos parasitas, sugerindo que ela possa cumprir alguma função de reparo, ou na replicação após um possível reparo em ambos os compartimentos celulares.

Sabe-se que em tripanosomatídeos, estão presentes diferentes tipos de reparo a danos causados por radiação U.V, Como o Global Genome Repair (GGR), que opera em regiões não codificantes do genoma e o transcription-coupled repair (TCR), o qual é ativado quando essa lesão ocorre diretamente no gene que será transcrito (Silva, D.G.P et.al., 2010).



**Fig. 7 Modificação na localização subcelular da proteína LaRbp38 após tratamento com  $H_2O_2$  e irradiação com luz U.V.** **A)** Ensaio de Imunofluorescência indireta usando soro anti-LaRbp38 marcado com alexa fluor 555(vermelho) com parasitas tratados com 2 mM de  $H_2O_2$ . O controle representa os parasitas não tratados com  $H_2O_2$ , seguido por parasitas após T0, 5, 15, 30 minutos e 1 e 3 horas após o tratamento. Em azul o DNA do núcleo (N) e cinetoplasto (K) corados com DAPI, Merged representa a sobreposição das imagens. **B)** Ensaio de Imunofluorescência indireta usando soro anti-LaRbp38 (alexa fluor 555(vermelho) com parasitas tratados por 1 minuto com 2.000 J de luz U.V. O controle (C) representa os parasitas não tratados com luz U.V, seguido por parasitas após T0, 5, 15, 30 minutos e 1 e 3 horas após a irradiação da cultura. Em azul o DNA do núcleo (N) e cinetoplasto (K), corados com DAPI, Merged representa a sobreposição das imagens.

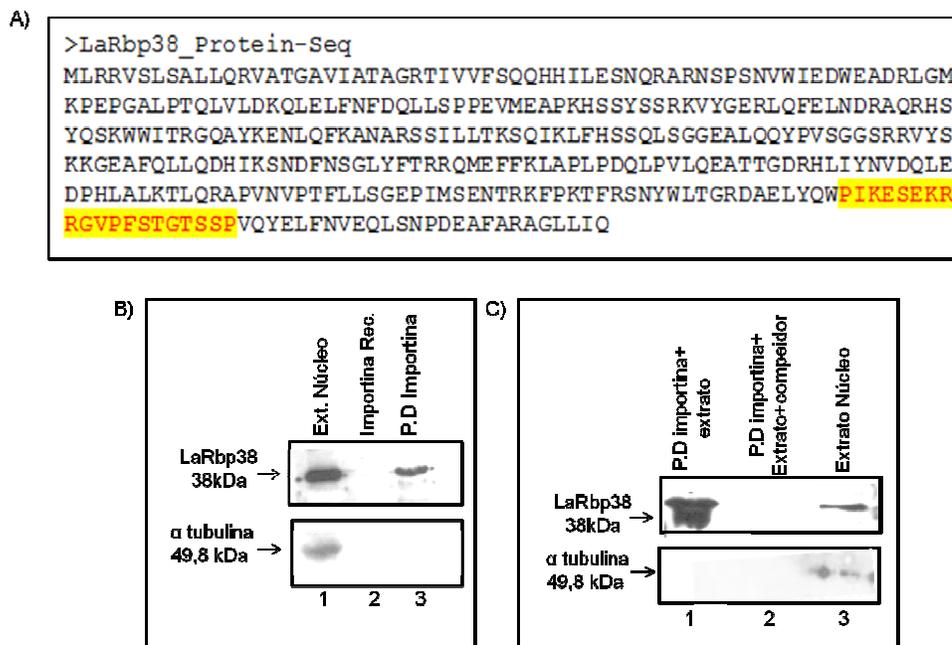
### 3.7 LaRbp38 apresenta um sinal de localização nuclear não clássico, que é mais um indício de sua translocação entre o núcleo e o cinetoplasto.

Diante dos resultados anteriores mostrando que a LaRbp38 transloca entre o cinetoplasto e o núcleo, e diante da existência de um sinal clássico de localização mitocondrial para esta proteína, resolvemos fazer uma busca em diferentes bancos de dados na tentativa de encontrar um possível sinal de localização nuclear (NLS) para LaRbp38. Utilizando-se ferramentas de bioinformática de

livre acesso não encontramos uma sequência de sinalização, porém através do algoritmo desenvolvido pelo grupo do Prof. Bostjan Kobe (Universidade de Queensland, Austrália) foi encontrado na sequência da LaRbp38 um possível NLS não clássico. Esse achado teve maior credibilidade após a publicação de um artigo de Kumar e colaboradores, mostrando a existência de NLSs não clássicos em ORC1 de *Leishmania donovani*. Assim como em ORC1, encontramos uma região na sequência primária, na extremidade C-terminal de LaRbp38 que também apresenta similaridade com o motivo descrito, além de possuir nessa sequência resíduos (KRR) (Fig.8 A), que segundo os autores são funcionalmente essenciais para o transporte destas proteínas para o núcleo (Kumar. D et al., 2012). Desta forma, tivemos mais um indício da localização nuclear de LaRbp38. Sendo assim, o fato de que LaRbp38 possui um NLS atípico e que esses medeiam a importação nuclear de proteínas ligando-se aos seus receptores, conhecidos como importinas (Kosugi. S, et al., 2009), resolvemos realizar ensaios em colaboração com o grupo do Prof. Marcos Fontes do departamento de biofísica da UNESP de Botucatu, que é especialista no estudo da importina  $\alpha$ , para verificar uma possível interação entre essas duas proteínas.

Primeiramente purificou-se a proteína importina  $\alpha$  recombinante de camundongo (Takeda, et al., 2011), que apresenta alto grau de similaridade com a sequência da importina  $\alpha$  de leishmania (Nº. de acesso GenBank: LmjF.30.1120 ), principalmente na região onde ocorre a interação com o NLS. Em seguida, foi realizado ensaio de captura por *Pull Down*, utilizando-se importina  $\alpha$  recombinante e extratos nucleares de *L.amazonensis*. Desta forma a proteína recombinante importina  $\alpha$  ligada a resina de níquel foi incubada com extrato nuclear de *L. amazonensis* e a resina contendo o(s) complexo(s) proteico(s) foi submetida a separação em gel SDS-PAGE 12% e posteriormente análise por *Western blotting* utilizando-se soro anti-LaRbp38. Como mostrado na Fig 8B, ocorre uma interação entre LaRbp38 e a importina  $\alpha$  de camundongo, sugerindo assim que o transporte de LaRbp38 ao núcleo pode ocorrer através de uma via clássica, ou seja, via interação com a importina  $\alpha$  (Kosugi. S, et al., 2009). Para confirmar se essa interação entre as proteínas LaRbp38 e importina

$\alpha$  ocorria via esse provável NLS não clássico (Fig.8A), foi sintetizado um peptídeo cuja sequência corresponde a esse NLS. Posteriormente foi realizado ensaio de *Pull Down* assim como o mostrado na fig.8B, utilizando o peptídeo sintético do provável NLS como competidor. Para tal incubamos 50  $\mu$ g da importina  $\alpha$  recombinante com um excesso de peptídeo (500 $\mu$ g) e posteriormente esta mistura foi incubada com a resina de níquel e extrato nuclear de *L.amazonensis*. Estes resultados foram analisados após o fracionamento da resina contendo o complexo, em gel SDS PAGE12% e posterior *Western blotting* utilizando-se soro anti-LaRbp38. De acordo com a fig.8C, podemos observar que no ensaio onde utilizamos o peptídeo do NLS como competidor, não houve interação entre as proteínas LaRbp38 e a importina  $\alpha$ , indicando que o sítio de interação de LaRbp38-importina  $\alpha$  estava provavelmente ocupado pelo NLS, comprovando então que a sequência descrita (sublinhada) na fig.8A, pode ser um NLS não clássico ainda não descrito para LaRbp38.



**Fig.8 LaRbp38 possui um sinal de localização nuclear atípico e interage com a importina $\alpha$ , uma proteína envolvida com o transporte de proteínas ao núcleo.** A) De acordo com análises in silico, foi possível determinar um possível NLS não clássico para a proteína LaRbp38, que encontra-se sublinhado em amarelo na figura. B) *Western Blotting* do ensaio de *Pull down* realizado com a proteína importina recombinante e extratos nucleares de *L.amazonensis*, revelado com soro anti-LaRbp38 e anti- $\alpha$  tubulina como controle de *loading*. Ext. Núcleo(linha1), corresponde ao extrato utilizado no experimento, seguido pela proteína importina recombinante (linha 2), usada como controle do ensaio e após resina do pull down contendo os interatores da importina (linha 3),

no caso a LaRbp38. C) *Western Blotting* do ensaio de *Pull down* realizado com a proteína importina, peptídeo do NLS de LaRbp38 como competidor, cuja sequência está sublinhada no item A e extratos nucleares de *L. amazonensis*, revelado com soro anti-LaRbp38. PD importina+ extrato corresponde a resina do pull down contendo os interatores da importina (linha 1), no caso a LaRbp38, Ext. Nucleo corresponde ao extrato utilizado no experimento.

De acordo com todos esses resultados, podemos determinar que LaRbp38 possui localização subcelular no núcleo e no cinetoplasto de *L. amazonensis*, sendo que o transporte dessa proteína ao núcleo provavelmente ocorre via a interação com a importina  $\alpha$ , através de um NLS não clássico presente na LaRbp38. Segundo Kumar e colaboradores em leishmanias esses NLSs, assim como em eucariotos superiores, são compostos por sequências ricas em aminoácidos básicos, sendo que este sítio pode apresentar-se monopartido ou com distribuições mais complexas.

As mitocôndrias têm seu próprio DNA (mtDNA) com replicação local, funções de transcrição e tradução. A maioria das proteínas mitocondriais são codificadas por genes nucleares e transportados para a mitocôndria. Algumas destas proteínas são compartilhadas entre a mitocôndria e o resto da célula. Em alguns casos, isoformas separadas da mesma proteína, são transportados para o núcleo ou para a mitocôndria. Em outros casos, diferentes genes no genoma nuclear codificam para proteínas que desempenham a mesma função nas mitocôndrias e em outros lugares na célula. (Valgardsdottir, R et al., 2001). Com base nesses dados e em todos os ensaios realizados, podemos sugerir que diferentemente da Rbp38 de *T. cruzi* e *T. Brucei* a LaRbp38 possui localização subcelular tanto no núcleo quanto no cinetoplasto, o que é consistente com a presença do sinal de localização mitocondrial (MLS) e o sinal de localização nuclear (NLS) que esta proteína carrega. No caso da p38 de *T. brucei* é possível que a proteína apresente 2 isoformas, uma com função nuclear e outra com função no cinetoplasto, à semelhança da proteína Pif1 que tem função telomérica e mitocondrial em mamíferos e leveduras (Zhang et al., 2006, Futami, et al., 2007). É possível que no caso de *T. brucei*, Liu et.al. (2006) só foram capazes de examinar a expressão da isoforma presente no cinetoplasto. Isto se explicaria pelo fato de que já existem evidências mostrando que outras proteínas em *T. brucei* possuem isoformas com funções em organelas

diferentes. Um bom exemplo é a Topoisomerase II, que em *T. brucei* apresenta dois genes codificando duas isoformas, as quais têm funções separadas no núcleo e no cinetoplasto (Kulikowicz e Shapiro, 2006). Já em *Leishmania* e *T. cruzi* a Topoisomerase II é codificada por um único gene (Das et al., 2001, Das et al., 2006). No caso de LaRbp38, especulamos que apenas uma proteína exerça funções diferentes em ambas organelas (mitocôndria/cinetoplasto e núcleo), o que em partes foi comprovado nos ensaios *in vivo* de imunoprecipitação de cromatina por Lira et al. (2007) e por nós, nesta tese. É provável que em *Leishmania* a proteína LaRbp38 tenha capacidade de se translocar pelos diferentes compartimentos celulares durante o ciclo de vida do parasita. Mais ainda, a baixa frequência de visualização de LaRbp38 no núcleo, ou sua passagem transiente por esta organela, nos parasitas, poderia ser explicada também pelo fato de que no cinetoplasto a proteína é requerida em abundância durante a replicação de milhares de cópias de DNA de mini-círculo, enquanto que no núcleo a quantidade de LaRbp38 requerida talvez ocorra em níveis abaixo do detectável pelas técnicas usuais de microscopia de fluorescência. Este fato acontece, por exemplo, com a proteína TzCRK1 de *T. brucei*, onde a proteína aparece em quantidades quase indetectáveis no núcleo, porém se acumula em grande quantidade no cinetoplasto (Gómez et al., 2006).

Além disso, após a indução de danos o trânsito da LaRbp38 aumenta entre os compartimentos, ocorrendo um aumento da sua localização nuclear, que pode ser um indício de que esta proteína apresenta diferentes funções relacionadas ao metabolismo de DNA nos diferentes compartimentos subcelulares.

O transporte de proteínas da mitocôndria/cinetoplasto para o núcleo ou vice e versa é um fenômeno relativamente desconhecido. Várias vias já foram sugeridas, porém pouco se sabe sobre esses mecanismos (Valgardsdottir, R et al., 2001), sendo assim o estudo deste trânsito da proteína LaRbp38 pelos diferentes compartimentos subcelulares pode se tornar uma valiosa ferramenta para os estudos destes processos.

#### 4.0 Referências Bibliográficas

- Cruet-Hennequart, S., S. Coyne, M.T. Glynn, G.G. Oakley, M.P. Carty.** (2006). UV-induced RPA phosphorylation is increased in the absence of DNA polymerase eta and requires DNA-PK. *DNA Repair (Amst)*. 5:491-504.
- Degrave, W., Fernandes, O., Campbell, D., Bozza, M., Lopes, U.** (1994). Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review., Rio de Janeiro, vol. 89(3): 463-469
- Duhagon, M. A., Dallagiovanna, B., Ciganda, M., Ruyechan, W., Williams, N., Garat, B.** (2003) A novel type of single-stranded nucleic acid binding protein recognizing a highly frequent motif in the intergenic regions of *Trypanosoma cruzi*. *Bioch and Bioph Res Com*, 309: 183-188.
- Duhagon, M. A. ; Pastro, Lucia ; Sotelo-Silveira, Jose R ; Perez-Diaz, Leticia ; Maugeri, Dante ; Nardelli, Sheila C ; SCHENKMAN, S. ; Williams, Noreen ; Dallagiovanna, Bruno ; Garat, Beatriz.** (2009). The *Trypanosoma cruzi* nucleic acid binding protein Tc38 presents changes in the intramitochondrial distribution during the cell cycle.. *BMC Microbiology (Online)*, v. 9, p. 34.
- Eslami B, Nabavi SF, Nabav SM, Ebrahimzadeh MA, Mahmoudi M.** (2011). Pharmacological activities of *Hypericum scabrum* L. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 15(5):532-7
- Everse, J.; Everse, K. E.; Grisham, M. B.** (1991). *Peroxidases in Chemistry and Biology*, CRC Press: New York.
- Fernandez, M.F., Castellar, R.R., Conte, F.F., Gozzo, F.C., Sabino, A.A., Pinheiro, H., Novello, J.C., Eberlin, M.N., Cano, M.I.** (2004) Identification of three proteins that associate in vitro with the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* G-rich telomeric strand. *Eur J Biochem*, 271(14):3050-63.
- Fragaki, K. et al.** (2003). A novel *Leishmania infantum* nuclear phosphoprotein Lepp12 which stimulates IL1-beta synthesis in THP-1 transfectants. *BMC Microbiol.*, v.3, p.7.
- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., e Pelicci, P.G.** (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 722-728.
- Jamieson, D.J.** (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1511-1527
- Lira, C.B.B., Giardini, M.A., Siqueira Neto, J.L., Conte, F.F., Cano, M.I.N.** (2007a) Telomere Biology of Trypanosomatids: beginning to answer some questions. *Trends Parasitol.* 23, 357-362
- Lira, C. B. B., Siqueira Neto, J.L., Khater, L., Cagliari, T., Peroni, L., Reis, J. R., Ramos, C., Cano, M. I. N.** (2007b) LaTBP1: a *Leishmania amazonensis* DNA-binding protein that associates *in vivo* with telomeres and GT-rich DNA using a myb-like domain. *Arch. Biochem. Biophys.*, 465, 399-409.
- Lira, C.B.B., Siqueira Neto, J.L., Giardini, M.A., Winck, F.V., Ramos, C.H.I., Cano, M.I.N.** (2007c) LaRbp38: a *Leishmania amazonensis* protein that binds nuclear and kinetoplast DNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* ,05.005.
- Liu, B, Molina, H, Kalume, D, Pandey, A, . Griffith, J,D & Englund, P,T.** (2006). Role of p38 in Replication of *Trypanosoma brucei* Kinetoplast DNA, *Molecular And Cellular Biology*. 5382-5393.
- Longhese, M. P., Plevani, P. and Lucchini, G.** (1994). Replication factor A is required in vivo for DNA replication, repair and recombination. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7884-7890.
- Moradas-Ferreira, P., Costa, V., Piper, P. & Mager, W.** (1996). The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Mol Microbiol* 19, 651±658.
- Devanand Kumar, Diwakar Kumar and Swati Saha.** (2009). A highly basic sequence at the N-terminal region is essential for targeting the DNA replication protein ORC1 to the nucleus in *Leishmania donovani*. *FEMS Microbiology Letters* 1-434/964-4100.

**Sbicego S, Alfonzo JD, Estevez AM, Rubio MA, Kang X, Turck CW, Peris M, Simpson L.**(2003). RBP38, a novel RNA-binding protein from trypanosomatid mitochondria, modulates RNA stability. *Eukaryot Cell*. 560-568.

**Schafer F, Buettner G** (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30 (11): 1191-212.

**Silva, D. P. C., Rajão M, A., Aguiar, P. H. N., Rocha, J. P. V., Machado, C. R., Furtado, C.**(2010). Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. *Journal of Nucleic Acids*, 2010/840768.

**Smith, J., Zou, H., Rothstein, R.** (2000) Characterization of genetic interactions with RFA1, the role of RPA in DNA replication and telomere maintenance. *Biochimie* 82, 71-78.

**Suman, S., Seth, R. K., Chandna, S.**(2009). Mitochondrial antioxidant defence in radioresistant Lepidopteran insect cells. *Bioinformatics* 4(1): 19-23.

**Symington LS.** (2002). Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* ,66:630–700

**Wang W, Osenbroch P, Skinnnes R, Esbensen Y, Bjørås M, Eide L.** (2010). Mitochondrial DNA integrity is essential for mitochondrial maturation during differentiation of neural stem cells. *Stem Cells* 28:2195–2204.

**Weber C, Marchat LA, Guillen N, LOpez-Camarillo C.**( 2009). Effects of DNA damage induced by UV irradiation on gene expression in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*.164(2):165-9. PMID: 19138709.

**Wold, M.S.** (1997) Replication Protein A, a heterotrimeric, ssDNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 61–91.

**WU,X.; SHELL, S.M.; ZOU, Y.**(2005) Interaction co-localization of Rad9/Rad1/Hus1 checkpoint complex with replication protein A in human cells. *Oncogene*, 24. 4728-4735.

### 3.3 Capítulo 3

#### **LaRbp38 pode fazer parte de um possível complexo *shelterina-like* em *L.amazonensis*.**

##### **Resumo**

Os finais dos cromossomos são compostos por arranjos de repetições teloméricas, os quais interagem com uma variedade de proteínas, que formam um complexo, cuja função é proteger esses terminais denominados telômeros. Rbp38 é uma proteína exclusiva dos tripanosomatídeos, o que inclui *L.amazonensis*, o agente etiológico da leishmaniose tegumentar nas Américas. LaRbp38 interage *in vivo* com os telômeros e está envolvida com a replicação nuclear e do kDNA. LaRbp38 contém um motivo não conservado de ligação a DNA e um possível *TRFH docking motif* [FXLXP] na região C-terminal, o qual em vertebrados, é encontrado em proteínas recrutadas ao complexo telomérico pelas proteínas TRFs. Este *docking motif* contribui para a estabilização das TRFs nos telômeros e para regulação do comprimento dos telômeros. Um homólogo da proteína TRF caracterizado em *L.amazonensis* (LaTRF), apresenta um domínio conservado de ligação a DNA do tipo *Myb-like* e um possível domínio de homodimerização e de interação-proteína-proteína (TRFH domain), que contém peptídeos que interagem especificamente com proteínas que contem o TRFH *docking motif*. Extratos nucleares do parasita e soros imune anti-LaTRF e anti-LaRbp38, foram usados para realização de ensaios de imunoprecipitação. Proteínas recombinantes expressas em sistema bacteriano foram produzidas, incluindo mutantes truncados da proteína LaRbp38, as quais foram utilizadas em ensaios de captura do tipo *Pull Down*. Resultados preliminares mostraram que LaRbp38 e LaTRF co-imunoprecipitam e suas interações físicas foram confirmadas por ensaio de captura por *Pull Down*, usando extratos nucleares de *L.amazonensis*. Através de análises *in silico* e ensaios de captura usando proteínas recombinantes e mutantes truncados, pudemos demonstrar que LaRbp38 interage fisicamente com a LaTRF, usando um *TRFH docking motif* parasita-específico (ALKTL). Este motivo é muito conservado entre ortólogos de Rbp38 dos tripanosomatídeos e apresenta conservação entre motivos análogos descritos em proteínas teloméricas de vertebrados, como por exemplo a TIN2 que interage diretamente com parálogos das TRFs em mamíferos e juntas fazem parte do complexo *shelterina*. Os resultados, sugerem que LaRbp38 pode ser uma proteína análoga a TIN2, podendo fazer parte de um possível complexo *shelterina-like* em *Leishmania*.

##### **Abstract**

#### **LaRbp38 can form part of a possible *shelterina-like* complex in *L.amazonensis*.**

The ends of the chromosomes are characterized by arrays of telomeric repeats which interact with a variety of proteins forming high order complexes whose function is to ensure proper telomere maintenance. Rbp38 is a protein exclusive of trypanosomatids, including *L. amazonensis*, the etiologic agent of Tegumentar leishmaniasis in the Americas. LaRbp38 interacts *in vivo* with telomeres and is involved with nuclear and kDNA replication. LaRbp38 contains a non-conserved DNA binding domain and a putative C-terminal TRFH docking motif [FxLxP], which in vertebrates, is found in proteins recruited to the telomeric complex by TRF proteins. This docking motif, contributes to the stabilization of the TRFs on telomeres and to telomere length regulation. A homologue of the TRF proteins characterized in *L. amazonensis* (LaTRF) presents a conserved Myb-like DNA binding domain and a putative dimerization and protein-interacting TRFH domain which accepts [FxLxP] peptide motifs. Nuclear parasite extracts and homologous anti-LaTRF and ant-LaRbp38 sera were used for the immunoprecipitation assays. Recombinant

proteins expressed in bacterial systems were produced, including the constructions of truncated mutants, which were used in pull-down assays. The preliminary characterization of the interaction among LaRbp38 and LaTRF showed that both proteins co-immunoprecipitate and their physical interaction was confirmed by pull-down capture assays using nuclear extracts. By *in silico* analysis and direct pull-down assays with recombinant proteins and truncated mutants, we also demonstrated that LaRbp38 interacts with LaTRF using a parasite-specific TRFH docking motif (ALKTL). LaRbp38 TRFH docking motif is very conserved among the trypanosomatid Rbp38 orthologs and shares some conservation among the analogous motifs described in vertebrate telomeric proteins, such as Tin2 protein.

## **1.0 Introdução**

As extremidades dos cromossomos são compostas por complexos nucleoproteicos, cuja função é assegurar a manutenção adequada dos telômeros. Em leishmania um grande número de proteínas encontram-se associadas aos telômeros, entre elas está a Rbp38, uma proteína exclusiva dos tripanosomatídeos, envolvida com a replicação nuclear e do kDNA. Resultados do nosso grupo mostraram que Rbp38 de *leishmania amazonensis* (LaRbp38), interage com uma proteína, que também faz parte do complexo telomérico, a LaTRF, que pertence a uma classe de proteínas que atuam *in cis* como reguladores negativos na manutenção dos telômeros e algumas, como a TRF2, estão envolvidas com a formação do *t-loops* (Griffith et al., 1999). A proteína TRF2 de humanos, assim como outras proteínas teloméricas já descritas, interage com uma terceira classe de proteínas, as quais não se ligam diretamente ao DNA, porém auxiliam na regulação da estrutura telomérica formando complexos de alto peso molecular (*shelterin*) (Li et al., 2003, Ye et al., 2004; Liu et al., 2004). Este complexo é formado por três proteínas que interagem diretamente com o DNA: TRF1, TRF2 e POT1 que são interconectadas por outras três proteínas: TIN2, TPP1 e RAP1 que não interagem diretamente com o DNA. Este complexo chamado *shelterina* sofre remodelamento, atuando junto com fatores de reparo de DNA e desta forma protege os telômeros (de Lange, 2005). A Proteína TIN2 é o componente central do complexo *shelterina*, que não somente conecta TPP1/POT1 a outros componentes, mas também estabiliza TRF1 e TRF2, na dupla fita telomérica. Resultados ainda não publicados do nosso grupo mostraram que a LaRbp38, assim como TIN2 possui sequências que a direcionam para uma localização nuclear e também mitocondrial

(Songyang et al., 2012), além de que a LaRbp38 contém um domínio não conservado de ligação a DNA (Perez, et al submetido), e um motivo putativo de interação com a proteína LaTRF, o TRFH *docking motif*, que é encontrado em proteínas que interagem com as TRFs de vertebrados. Este motivo de ancoragem, contribui para a estabilidade das proteínas e para a regulação do comprimento dos telômeros. Várias proteínas associadas ao complexo shelterina reconhecem essa região denominada *TRFH surface groove*. Por exemplo, proteínas que interagem com a TRF1 usam um motivo do tipo FxLxP e as que interagem com TRF2 usam um motivo do tipo YxLxP. Uma das proteínas que reconhecidamente possui em sua sequência de aminoácidos esse pequeno motivo conservado do tipo FxLxP é a TIN2 a qual foi caracterizada por interagir simultaneamente com hTRF1 e hTRF2 (Campisi et al., 2004). Assim, acreditamos que LaRbp38 possa ter função correlata à TIN2, tanto em processos metabólicos quanto participando de um complexo interagindo com TRF.

Em mamífero nota-se a presença de dois complexos com funções distintas. Um em que TRF1 e TRF2 interagem com proteínas presentes na simples fita telomérica através de TIN2-POT1 regulando o tamanho do telômero e outro através da interação de TRF2 com RAP1 que protege os terminais recrutando maquinaria de reparo de DNA (Loayza et al., 2011; de Lange et al., 2011).

Aqui mostramos resultados de análises *in silico* e ensaios de interação proteína-proteína, que sugerem fortemente a interação entre as proteínas LaRbp38 e LaTRF e também mostram a presença de um novo domínio de interação, presente em outras proteínas que interagem com as TRFs em vertebrados e que fazem parte do complexo *shelterina*, o que nos leva a crer que a LaRbp38 possa fazer parte de um possível complexo *shelterina-like* em *L.amazonensis*.

## **2.0 Materiais e métodos**

### **2.1. Cultura de parasitas**

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

### **2.2 Obtenção dos extratos protéicos de núcleo de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis***

Extratos de núcleo de formas promastigotas foram obtidos na presença de inibidores de proteases, segundo protocolo proposto por Fragaki et al. (2003).

### **2.3 Análise *in silico* de motivos conservados de interação proteína:proteína na sequência primária de LaRbp38**

Estas análises foram realizadas no intuito de verificar a existência de motivos conservados de interação proteína: proteína já descritos na literatura. Nestas análises usamos o programa *Eukaryotic Linear Motif resource* (elm.eu.org) que prediz a existência de motivos lineares curtos de interação proteína:proteína em eucariotos. Também utilizamos os programas ClustalW e *Blastp* para realizar pareamentos múltiplos entre as sequências das proteínas LaRbp38 de tripanosomatídeos e as TIN2 descritas em diferentes vertebrados.

### **2.4 Identificação *in vitro* das possíveis interações físicas entre LaRbp38 e LaTRF**

#### **2.4.1 Estudo das interações proteína:proteína por imunoprecipitação**

A imunoprecipitação é uma técnica comum para se estudar as interações entre uma ou mais proteínas utilizando-se, para tanto, um anticorpo que imunoprecipite a proteína utilizada como isca (*bait*) e por sua vez co-imunoprecipite qualquer proteína que interaja especificamente com ela (*prey*). Para esse experimento utilizamos o kit Seize X Protein A Immunoprecipitation, que oferece vantagens sobre os métodos clássicos de imunoprecipitação, porque permite a imobilização do anticorpo à Proteína A, usando um agente que liga covalentemente o anticorpo à resina (cross-linker

DSS). Isto resulta em um suporte contendo o anticorpo apropriadamente orientado o qual não é eluído juntamente com as proteínas imunoprecipitadas. Para estes ensaios foram usados extratos protéicos (nucleares) obtidos de formas promastigotas dos parasitas. As proteínas contidas nestes extratos foram imunoprecipitadas com o soro imune produzido em coelho contra as proteínas LaRbp38 e LaTRF. As proteínas que co-eluíram com a proteína alvo foram fracionadas em gel SDS-PAGE e identificadas por *Western blot* utilizando-se soro imune específico.

#### **2.4.2 Confirmação das interações proteína:proteína por captura usando ensaio *Pull-down***

O método de *Pull-down* é muito utilizado para determinar a interação física entre duas ou mais proteínas. Também são muito úteis para se confirmar interações preditas, por outras técnicas, entre proteínas. O requisito mínimo para este ensaio é a disponibilidade de uma proteína purificada (marcada com um *tag* ou não), que servirá como isca para capturar sua(s) proteína(s) parceiras (interatores). Para estes ensaios utilizamos as proteína recombinante LaRbp38 e LaTRF fusionada com um 6x *His tag* como ligante a resina de níquel.

#### **2.4.3. Ensaio *Pull-down* com uso de extrato nuclear do parasita como fonte de proteínas interatoras**

Extratos proteicos nucleares obtidos de formas promastigotas do parasitas foram utilizados como fonte para possíveis proteínas parceiras de LaRbp38. Para o experimento foram incubados previamente 100 µg de extrato de núcleo com 150 µg de proteína LaRbp38 recombinante expressa contendo uma cauda 6x *His tag*, por 12 horas a 4 °C. Após a primeira incubação, o possível complexo formado por LaRbp38 foi incubado por 4 horas a 4 °C com 100 µl de resina de níquel (*NiNTA Superflow – Qiagen*). Após lavagens em tampão para *Pull-down* (50 mM Tris-HCL pH 8,0, 1% NP40 e 1% inibidor de protease), foi adicionado *Loading buffer 5X* à resina de níquel contendo o possível complexo formado por LaRbp38. Esta foi estocada a -20 °C.

#### **2.4.4. Ensaio *Pull-down* para verificar interações diretas entre proteínas recombinantes.**

Para confirmação das possíveis interações verificadas pelo método acima, seguimos com ensaios de *Pull-down*, porém, agora somente com incubações diretas entre as proteínas recombinantes. Inclusive para o experimento, foram purificados mutantes truncados de LaRbp38 na tentativa de encontrar a possível região de LaRbp38 que interage com LaTRF. Para isso as caudas 6X *His tag* das proteínas recombinantes purificadas: LaTRF, LaRbp38, LaRbp38mut4 (sem o motivo FKLAP) e LaRbp38mut6 (com o motivo FKLAP) foram clivadas utilizando trombina (Sigma).

Para estes experimentos as proteínas recombinantes (100 µg de LaTRF, 50 µg de LaRbp38, 100 µg de LaRbp38mut 4 e 100 µg de LaRbp38mut6) foram tratadas com 100 µg de trombina (sigma) por 12 horas a 4 °C para a retirada da cauda 6X *His tag*. Como controle, amostras tratadas com trombina foram analisadas por SDS-PAGE. Após o tratamento, as proteínas foram testadas nos ensaios de captura, duas a duas, seguindo-se com incubação das misturas por 12 horas a 4 °C.

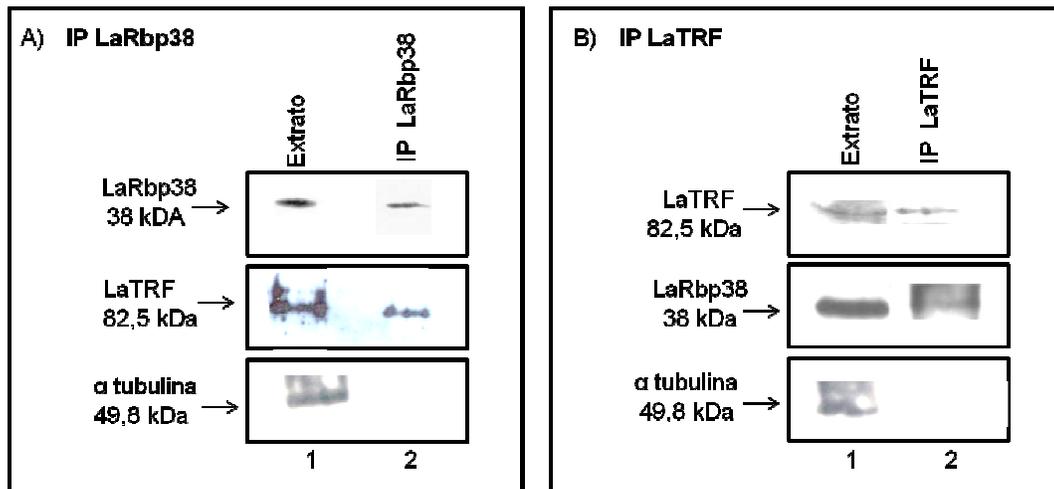
Em seguida as amostras foram incubadas com 100 µl de resina de níquel (*NiNTA Superflow – Qiagen*) por 4 horas a 4 °C. As resinas contendo os possíveis complexos foram lavadas 3X em tampão para *Pull-down* (50 mM Tris-HCL pH 8,0, 1% NP40 e 1% inibidor de protease), ressuspensas em 20 µl de *Loading buffer 5X* e estocadas a -20 °C para posterior análise da formação dos complexos em gel 8-12% SDS-PAGE.

### **3.0 Resultados e discussão**

#### **3.1 LaRbp38 interage com a proteína LaTRF, podendo fazer parte de um complexo *shelterina-like* em *L.amazonensis*.**

Resultados recentes no nosso laboratório, de imunoprecipitação e *Pull down* mostraram a interação entre as proteínas LaRbp38 e LaTRF, assim como mostrado na fig.1 A e B, que representa ensaios de imunoprecipitação cruzada usando soros anti-LaRbp38 e anti-LaTRF e extratos nucleares de *L.amazonensis*. Esse fato nos chamou bastante atenção e baseado nesses achados

resolvemos fazer diversas análises em bancos de dados, onde obtivemos resultados bastante interessantes sobre a possível participação de LaRbp38 em um possível complexo shelterina-like em *L. amazonensis*, como uma proteína análoga de TIN2.



**Fig.1: Interação das proteínas LaRbp38 e LaTRF.** **A)** Imunoprecipitação realizada com soro anti-LaRbp38 e extrato nuclear de *L. amazonensis*. Cont.(linha 1) representa o extrato nuclear utilizado no experimento, IP (linha 2) corresponde ao eluato da imunoprecipitação contendo os interatores de LaRbp38. Ensaio foi revelado com soro anti-LaRbp38 como controle positivo, anti-LaTRF, para verificação da interação com LaRbp38 e anti- $\alpha$  tubulina como controle de *loading*. **B)** Imunoprecipitação realizada com soro anti-LaTRF e extrato nuclear de *L. amazonensis*. Cont.(linha 1) representa o extrato nuclear utilizado no experimento, IP (linha 2), corresponde ao eluato da imunoprecipitação contendo os interatores de LaTRF. Ensaio foi revelado com soro anti-LaTRF, como controle positivo, anti-LaRbp38, para verificação da interação com a proteína LaTRF e anti- $\alpha$  tubulina como controle de *loading*.

### 3.2 Análises *in silico* mostram a presença de um motivo do tipo *TRFH docking* em LaRbp38

Resultados *in silico* através de banco de dados, mostraram que a LaRbp38 contém um domínio não conservado de ligação a DNA e que também possui um motivo curto e conservado de interação com as proteínas TRF, verificado através de um mapeamento usando o programa ELM (elm.eu.org). Este motivo é denominado de *TRFH docking motif* que na LaRbp38 é composto pela sequência FKLAP. Várias proteínas associadas ao complexo *shelterina* reconhecem uma região denominada *TRFH surface groove* presente nas proteínas TRF, o qual reconhecem motivos [F[Y]xLxP. Uma das proteínas que reconhecidamente possui em sua sequência de aminoácidos esse

pequeno motivo conservado do tipo FxLxP é a TIN2 a qual foi caracterizada por interagir simultaneamente com hTRF1 e hTRF2 (Campisi et al., 2004). Além disso, assim como Rbp38, TIN2 possui sequências que a direcionam para uma localização nuclear e também mitocondrial (Songyang et al., 2012). Assim, acreditamos que LaRbp38 possa ter função correlata à TIN2 tanto em processos metabólicos quanto em participar de um complexo interagindo com TRF.

Para seguirmos com os experimentos foram feitos diversos alinhamentos globais entre as sequências de Rbp38 dos tri-tryps, que mostraram que o core deste motivo FKLAP só é conservado nos três primeiros resíduos de aminoácidos (Fig. 2A). Por outro lado, o pareamento global entre as sequências de TIN2 de vertebrados (Fig.2B) mostra que o core deste motivo é idêntico entre as TIN2 de mamíferos, cuja sequência é FNLAP, porém na TIN2 de *Xenopus laevis*, a sequência não é conservada (PKQTL) embora seja funcional (Simonsson, 2009).

Ao realizarmos pareamento múltiplo entre as Rbp38 de *Leishmania* spp. e a TIN2 de humanos verificamos que não ocorria pareamento entre estas sequências na região demarcada pela localização dos motivos *TRFH docking* de ambas as proteínas, como mostrado na Fig 2C. De qualquer maneira, levamos adiante os experimentos *in vitro* para confirmar a interação previamente observada entre LaRbp38 e a LaTRF.

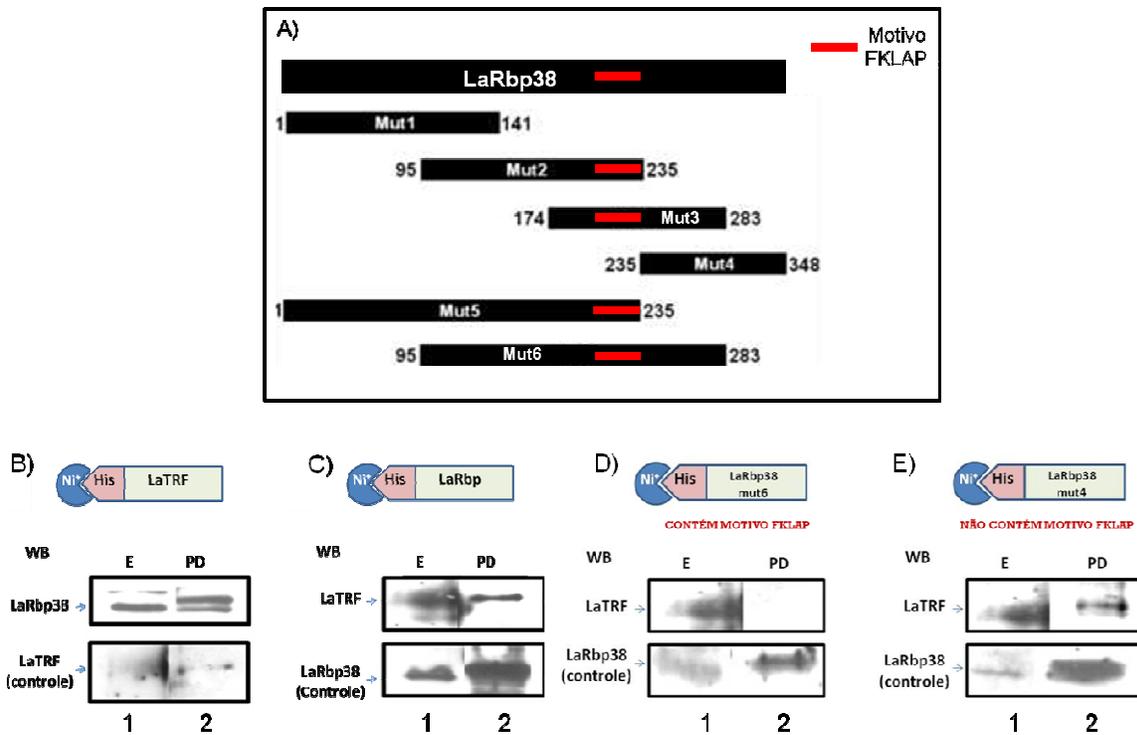


*TRFH docking motifs de Leishmania spp.* (FKLAP) e TIN2 humana (FNLAP), revelou uma impossibilidade de alinhamento.

### **3.3 A interação entre LaRbp38 e a LaTRF ocorre provavelmente via uma região que não contém o motivo conservado FKLAP.**

Com objetivo de comprovar os possíveis complexos capturados na imunoprecipitação (Fig. 1A-B), seguimos com ensaios de *Pull-down* para detecção de interações físicas entre LaRbp38 e a proteína LaTRF. Esses ensaios foram realizados segundo protocolo descrito por Web et al. (1997), utilizando as proteínas LaTRF, LaRbp38 e 2 mutantes de LaRbp38 denominados Mut.4, o qual não contém o domínio FKLAP descrito anteriormente como um possível sitio de ligação á proteína LaTRF, e o Mut.6, que contém o domínio FKLAP (Fig. 3 A), juntamente com extratos nucleares de *L.amazonensis* na tentativa de encontrar a possível região de interação entre LaRbp38 e LaTRF.

Após incubação das proteínas com os extratos em resina de níquel, para verificação das interações, esta foi fracionada em gel SDS-PAGE 8% e 12% seguido de *Western blot* usando soros específicos para as proteínas em estudo (Fig. 3 B-E).



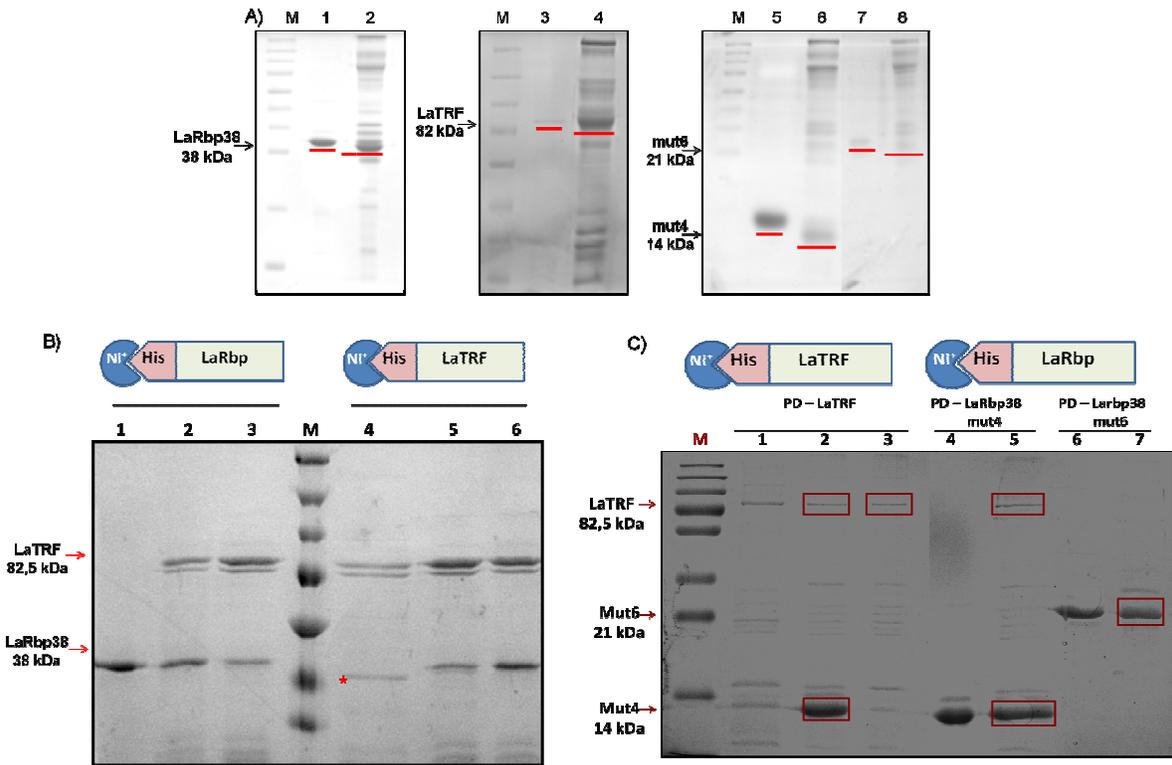
**Fig.3: LaRbp38 e LaTRF interagem fisicamente em uma região que não contém o motivo conservado FKLAP.** A) Foram construídos seis mutantes truncados sobrepostos de LaRbp38 no intuito de mapear a proteína. Em vermelho esta representado o core do motivo FKLAP que não está contido em dois mutantes (mut1 e mut4). **B-E):** Proteínas recombinantes contendo uma cauda 6X His tag foram incubadas com extrato proteico nuclear de *L. amazonensis* e depois ligadas a resina de níquel na tentativa da captura de proteínas interatoras. **B)** Western blot do ensaio de Pull Down feito com a LaTRF, revelado com soro anti-LaRbp38. **C)** Western blot do ensaio de Pull Down feito com LaRbp38, revelado com soro anti-LaTRF **D)** e **E)** Western blot do ensaio de Pull Down feito com os mutantes de LaRbp38 (Mut6 e Mut4 respectivamente) revelados com soro anti-LaTRF.

Quando a proteína LaTRFr é ligada a resina, podemos verificar uma interação física com LaRbp38 (Fig. 3B) a partir de extrato nuclear do parasita. Quando LaRbp38r é ligada a resina, confirmamos essa interação com a LaTRF (Fig. 3C). Além disso, foi possível detectar interação de LaTRF utilizando somente LaRbp38mut4r (não contém o motivo FKLAP) presa ao níquel e não com LaRbp38mut6r (Contém o motivo FKLAP) (Fig. 3 D e E), o que revela que a interação LaRbp38-LaTRF ocorra provavelmente via uma região que não contém o motivo conservado FKLAP.

### **3.4 A proteína LaRbp38 utiliza o motivo ALKTL para a interação com a proteína LaTRF.**

Com objetivo de confirmar as interações observadas anteriormente, o passo seguinte foi realizar ensaios de *Pull down* entre as proteína recombinantes LaRbp38, LaTRFr e os mutantes truncados de LaRbp38: mut6 onde se encontra o motivo FKLAP e o mut4 que é o fragmento da proteína onde não se encontra o motivo FKLAP (detalhes sobre os mutantes de LaRbp38 estão na Fig. 3A). Para isso os ensaios foram realizados com uma das proteínas tratadas com trombina para a retirada das caudas de *6XHis tag* (Fig.4 A). Depois de analisar os produtos da digestão com trombina por SDS-PAGE, foi possível constatar, através da diferença na migração das proteínas, que a cauda de *6X His tag* das proteínas recombinantes foi clivada. Podemos também visualizar bandas de possíveis clivagens inespecíficas realizadas pela trombina .

Diante desses resultados, seguimos então com os ensaios de interação direta entre LaRbp38 e /ou seus mutantes truncados e a proteína LaTRF. Nestes ensaios, proteínas recombinantes fusionadas a uma cauda *6X His-tag* foram incubadas diretamente com outras proteínas recombinantes sem a cauda *6X His-tag*, desse modo pôde-se detectar as interações pela observação do complexo ligado à resina de níquel. Para o experimento, foram incubadas a proteína LaRbp38 e seus mutantes truncados mut4 e mut6, sem a cauda *6X His-tag*, diretamente com a proteína LaTRFr. Foram verificadas também, as interações quando incubadas LaRbp38 e seus mutantes agora com a proteína LaTRF sem a cauda *6XHis tag*. A resina de níquel contendo as possíveis interações foi analisada por SDS-PAGE (Fig. 4 B e C).



**Fig. 4 LaRbp38 interage com LaTRF via mutante truncado de LaRbp38 que não possui motivo FKLAP (LaRbp38mut4).** **A)** Cauda 6X His-tag das proteínas recombinantes LaTRF, LaRbp38, LaRbp38mut4 e LaRbp38mut6 foram clivadas com trombina. Gel 10-15% SDS-PAGE mostrando o tratamento das proteínas: LaRbp38 (2), LaTRF (4), LaRbp38mut4 (6) e LaRbp38mut6 (8) com trombina. 1) LaRbp38 recombinante, 3) LaTRF recombinante, 5) LaRbp38mut4 recombinante e 7) LaRbp38mut6 recombinante. M - marcador de peso molecular *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder* (Sinapse). **B)** Gel SDS 12%, evidenciando interações diretas entre as proteínas recombinantes LaRbp38, LaTRF. 1) LaRbp38 recombinante. 2) LaRbp38 foi ligada ao níquel e incubada com 50 µg LaTRF tratada com trombina. 3) LaTRF recombinante. 5) LaTRF foi ligada ao níquel e incubada com 50 µg LaRbp38 tratada com trombina. **C)** Ensaio de *Pull down* utilizando os dois mutantes da proteína LaRbp38 (Mut4 e Mut6) e a proteína LaTRF. 1) LaTRF recombinante. 2 e 3) LaTRF foi ligada ao níquel e incubada com 100 µg de mut4 (2) e mut6 (3) tratados com trombina. 4) mut4 recombinante. 5) mut4 ligado ao níquel e incubado com 100 µg de LaTRF tratada com trombina. 6) mut6 recombinante. 7) mut6 ligado ao níquel e incubado com 100 µg de LaTRF tratada com trombina. M- marcador de peso molecular *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder* (Sinapse).

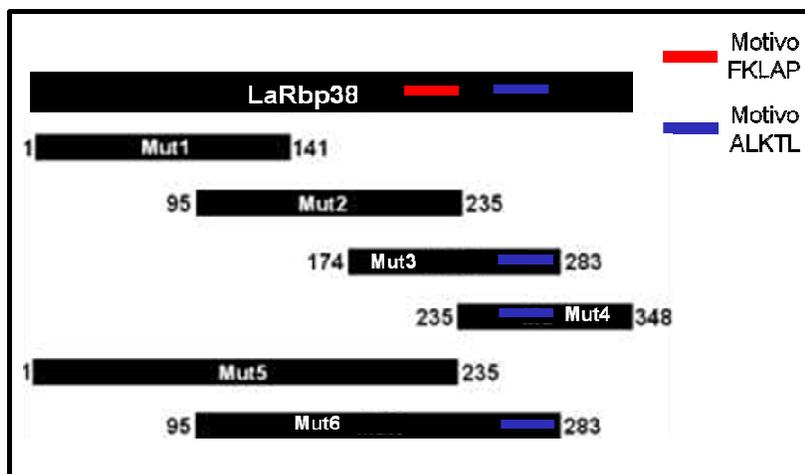
Em relação à incubação direta realizada entre LaRb38 e LaTRF, podemos, de fato, concluir que esta interação aconteceu e de forma mútua entre as duas proteínas recombinantes, uma vez que as duas proteínas foram capturadas na resina em que ocorreram as incubações diretas entre as proteínas recombinantes. (Fig. 4B).

Nas incubações realizadas entre LaRbp38 e os mutantes (mut4 e mut6) e LaTRF, mesmo com a presença de algumas inespecificidades, provavelmente devido ao tratamento com a trombina, podemos observar uma interação física de LaTRF com LaRbp38mut4 e não com LaRbp38mut6 (Fig. 4C). Esses resultados, portanto, confirmam os ensaios de *Pull-down* utilizando-se extrato proteico nuclear do parasita como fonte de interações físicas (Fig 3 B-E), o qual sugere que a interação entre as duas proteínas ocorre via uma região diferente de FKLAP.

Desse modo, foram feitos pareamentos globais utilizando-se o programa *Clustal W* somente com a região, caracterizada como LaRbp38mut4 em nossos experimentos. Lembramos aqui que não foi possível o pareamento entre *TRFH docking motifs* presentes em *Leishmanias spp.* (FKLAP) e o *TRFH docking motif* da TIN2 humana (FNLAP) (fig.2C). Curiosamente, ao parearmos as sequências de aminoácidos do *TRFH docking motif* presentes em *Xenopus laevis* (PKQTL) com Rbp38 de *Leishmania spp.*, é possível notar a existência de pareamento com uma outra sequência de aminoácidos conservada do tipo ALKTL (Fig.5A). Esta sequência está presente na região de LaRbp38 que, de acordo com nossos experimentos, está interagindo com LaTRF (LaRbp38 mut4). Além disso, também foi confirmado o pareamento entre as sequências de aminoácidos do *TRFH docking motif* da TIN2 humana (FNLAP) e a nova sequência conservada (ALKTL) encontrada em *Leishmania spp.* (Fig.5 B).

Quando pareamos a nova sequência de aminoácidos ALKTL de *Leishmania spp.* com os outros tripanosomatídeos, ocorreu pareamento e o grau de conservação foi muito maior comparado ao pareamento do *TRFH docking motif* FKLAP entre as sequências Rbp38 dos tri-tryps (Fig.5C).





**Fig.6 Regiões da proteína LaRbp38 que contém os diferentes motivos: FKLAP e ALKTL.** Representação esquemática das regiões que contém os diferentes motivos FKLAP em vermelho e ALKTL em azul.

O complexo shelterina atua em conjunto com diversos fatores associados. A maior parte das proteínas associadas a esse complexo, são recrutadas aos telômeros através da interação com as proteínas TRF1 e TRF2 como é o caso da proteína TIN2 de mamíferos. Vários tipos de interações proteicas foram mapeadas para os domínios TRFH-TRF1 e TRFH-TRF2. Ambos os domínios têm estrutura tridimensional semelhante e por isso fica difícil determinar como TRF1 e TRF2 podem interagir com diferentes proteínas, sugerindo a existência de variações estruturais para que possa ocorrer a interação com diferentes proteínas (Chen. Y et al., 2008)

Pesquisas em banco de dados mostram muitos exemplos de proteínas teloméricas associadas que podem interagir com as TRFs por esses domínios (Chen. Y et al., 2008), e já que LaRbp38 foi encontrada interagindo com LaTRF e por ela apresentar características semelhantes à proteína TIN2, sugerimos que provavelmente o sítio de interação entre essas proteínas (LaRbp38-LaTRF) seja diferente em leishmania e para isso novos estudos são necessários para desvendar os pormenores dessa interação que nos trará mais indícios de uma possível função de LaRbp38 como uma análoga da proteína TIN2 de humanos, podendo então fazer parte de um complexo *shelterina-like* em leishmania, interagindo diretamente com a proteína TRF.

#### 4.0 Referências Bibliográficas

- Campisi J., Kim S., Beausejour C., Davalos A. R., Kaminker P. and Heo S.** (2004). TIN2 Mediates Functions of TRF2 at Human Telomeres. *The Journal Of Biological Chemistry*, 43799–43804.
- Chen, Y; Yang, y; Overbeek, M.V; Donigian, J.R; Baciú, P; de Lange, T; Lei, M.** (2008). A Shared Docking Motif in TRF1 and TRF2 Used for Differential Recruitment of Telomeric Proteins, 316-190201906.
- Cooper, J., Nimmo, E., Allshire, R., Cech, T.** (1997). Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature* 385, 744-747.
- Da Silva, M. S., Perez, A. M., Da Silveira, R. C. V., De Moraes, C. E., Siqueira-Neto, J. L., Freitas-Junior, L. H. And Cano, M. I. N.** (2010). The *Leishmania amazonensis* TRF (TTAGGG repeat-binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres. *BMC Microbiology*, 10:136
- De Lange, T.** (2005). Shelterin, the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Development*, 19,2100-2110.
- Diotti R. And Loayza D.** (2011). Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus* 2:2, 119-135.
- Dmitriev, P. V., Petrov, A. V., Dontsova, O. A.** (2003). Yeast telosome complex, components and their functions. *Biochemistry* 68,718-34.
- Fernandez, M. F., Castellari, R. R., Conte, F. F., Gozzo, F. C., Sabino, A. A., Pinheiro, H., Novello, J. C., Eberlin, M. N., Cano, M. I. N.** (2004). Identification of three proteins that associate in vitro with the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* G-rich telomeric strand. *Eur J Biochem*, 271,3050-63.
- 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.
- Hanaoka, S., Nagadoi, A., Yoshimura, S., Aimoto, S., Li, B., De Lange, T., Nishimura, Y.** (2001). NMR Structure of the hRap1 Myb motif reveals a canonical three-helix bundle lacking the positive surface charge typical of Myb DNA-binding domains. *J. Mol. Biol* 312, 167-175.
- Lang, T., Lecoœur, H. E Prina, E.** (2009). Imaging *Leishmania* development in their host cells. *TrendsParasitol* 25, 464-473.
- Li, B., Espinal, A. E Cross, G.A.** (2005). Trypanosome Telomeres Are Protected by a Homologue of Mammalian TRF2. *Molecular and Cellular Biology*, 5011–5021.
- Lira, C. B., De Siqueira Neto, J. L., Khater, L., Cagliari, T. C., Peroni, L. A., Dos Reis, J. R., Ramos, C. H. & Cano, M. I.** (2007). LaTBP1: a *Leishmania amazonensis* DNA-binding protein that associates in vivo with telomeres and GT-rich DNA using a Myb-like domain. *Arch Biochem Biophys* 465, 399-409.
- Liu, D., O’coonor, M. S., Qin, J., Songyang, Z.** (2004). Telosome, a Mammalian telomere-associated Complex Formed by Multiple Telomeric Proteins. *J. Biol. Chem.* 279,51338-51342.
- Smogorzewska, A. & De Lange, T.** (2004). Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 177–208.
- Songyang Z., Chen L. Y., Zhang Y., Zhang Q., Li H., Luo Z., Fang H., Kim S. H., Qin L., Yotnda P., Xu J., Bai T.** (2012). Mitochondrial Localization of Telomeric Protein TIN2 Links Telomere Regulation to Metabolic Control. *Molecular Cell* 47, 839–850.
- Vizlin-Hodzic D., Ryme J., Simonsson S., And Simonsson T.** (2009). Developmental studies of *Xenopus* shelterin complexes: the message to reset telomere length is already present in the egg. *FASEB J.* 23, 2587–2594.

**Van Steensel, B., A. Smogorzewska, And T. De Lange. (1998).** TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92:401–413.

#### **4.0 Conclusões Gerais**

**Artigo 1 :** Mapeamento do domínio de ligação da proteína Rbp38 de *Leishmania amazonensis* para diferentes DNAs.

- LaRbp38 é capaz de ligar diferentes tipos de DNA : DNA simples e dupla fita teloméricos e kDNA.
- O domínio de ligação de LaRbp38 ao diferentes tipos de DNAs encontra-se em uma região da proteína que compreende os resíduos de 95 a 283, correspondente a região da proteína que compreende o Mut 6, composto de 188 aminoácidos.
- Esse(s) domínio(s), possivelmente se sobrepõe.
- Pode ser um novo domínio exclusivo dos tripanossomatídeos.

**Artigo 2:** A Proteína LaRbp38 transloca entre o núcleo e cinetoplasto em formas promastigotas de *leishmania amazonensis*.

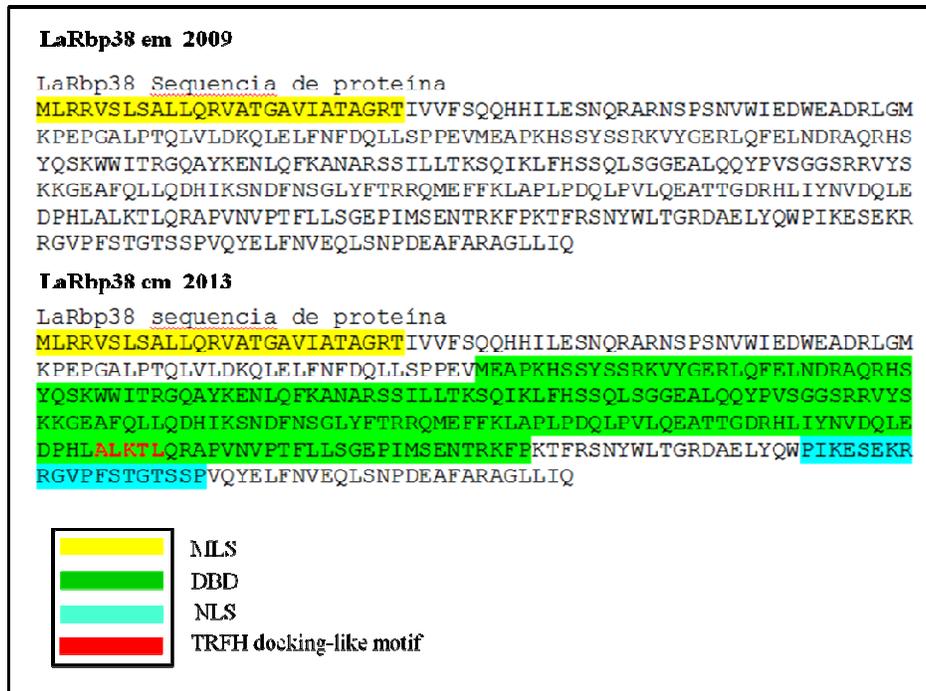
- LaRbp38 é capaz de translocar por diferentes compartimentos celulares utilizando um sinal de localização mitocondrial (MTS) presente no N-terminal e um sinal de localização nuclear (NLS), presente no C-terminal da proteína.
- LaRbp38 é mais abundante no cinetoplasto, porém é possível visualiza-la no núcleo quando o ciclo celular do parasita é sincronizado ou quando este é submetido a um estresse genotóxico (irradiação por luz U.V ou tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- Análises *in silico*, sugerem fortemente a existencia de um NLS no C-terminal da LaRbp38, que parece ser do tipo não clássico e não bipartido.
- Ensaio de interação proteína-proteína, mostraram a interação entre LaRbp38 e a proteína importina  $\alpha$ , sugerindo que a proteína LaRbp38 é transportada para o núcleo

provavelmente através de uma via denominada via-clássica, que utiliza interação com a importina  $\alpha$ .

**Artigo 3:** LaRbp38 pode fazer parte de um possível complexo *shelterina-like* em *L.amazonensis*.

- LaRbp38 contém um motivo do tipo *TRFH docking* encontrado em proteínas teloméricas que interagem com as proteínas da família das TRFs no complexo *shelterina* de vertebrados e mamíferos.
- Ensaios de interação proteína-proteína, mostraram que LaRbp38 interage fisicamente com a LaTRF, usando um motivo TRFH diferente do consensual.
- LaRbp38 interage com a LaTRF usando o motivo ALKTL, que compartilha similaridade de sequência, com motivos descritos em proteínas interatoras de TRFs e é bastante conservado entre as Rbp38 de tripanosomatídeos.
- LaRbp38 pode cumprir função análoga a uma das proteínas de vertebrados descritas como interatoras de TRFs, a proteína TIN2, podendo fazer parte de um possível complexo *shelterina-like* em *leishmania amazonensis*.

Tendo em vista os dados apresentados ao longo da tese, a fig.6 resume as contribuições deste trabalho no avanço da caracterização da proteína LaRbp38.



**Fig.6 :Contribuição dos resultados obtidos com a proteína LaRbp38 nesta tese.** A figura representa a sequencia de aminoácidos da proteína LaRbp38. Na primeira parte temos um panorama da proteína LaRbp38 antes da realização deste trabalho e abaixo o que foi descoberto durante o trabalho de doutorado. Em amarelo está a sequencia de aminoácidos que compõem o sinal de localização mitocondrial (MLS) de LaRbp38, em verde compreende a região do domínio de ligação de LaRbp38 aos diferentes tipos de DNA( DNA simples e dupla fita telomericos e kDNA), assinalados em vermelho está a sequencia do provável domínio de interação com as proteínas TRFs e por fim, em azul está a sequencia que corresponde ao sinal de localização nuclear (NLS) não clássico de LaRbp38.

De maneira resumida , foi possível determinar um domínio de ligação da proteína LaRbp38 a diferentes tipos de DNA: Tel1, LaTel e kDNA, e que este domínio pode ser novo e exclusivo dos tripanossomatídeos. Também foi possível determinar um sinal de localização nuclear (NLS) não clássico ainda não descrito, o que pode comprovar a localização nuclear da proteína, além disso também foi determinado um possível domínio de interação desta proteína com outras proteínas que podem fazer parte de um possível complexo *Shelterina-like* em *L.amazonensis*.

## 6.0 Referências Bibliográficas

- Antoniu, T. and K. A. Gough.** (2005) Early-onset pentamidine-associated second-degree heart block and sinus bradycardia: case report and review of the literature. *Pharmacotherapy* **25**: 899-903.
- Assan, R., C. Perronne, et al.** (1995) Pentamidine-induced derangements of glucose homeostasis. Determinant roles of renal failure and drug accumulation. A study of 128 patients. *Diabetes Care* **18** : 47-55
- Alberio, S.O; Dias, S.S; Faria, P. ; Mortara, R.A; Barbieri, C.L, Haapalainen, E.F.** (2004) Ultrastructural and cytochemical identification of megasome in *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Parasitol Res.* **92**: 246–254
- Baker, P. R. e Clauser, K. R.,** <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.html>
- Baumann, P. and Cech, T.R.** (2001). Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* **292**, 1171–1175
- Berman, J.** (2005) Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Curr Infect Dis Rep* **7**: 33-38.
- Bianchi, A., Smith, S., Chong, L., Elias, P., de Lange, T.** (1997) TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J.* **16**, 1785-1794.
- Bochkarev A, Bochkareva E.** (2004) From RPA to BRCA2, lessons from single-stranded DNA binding by the OB-fold. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **14**, 36-42.
- Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L., de Lange, T.** (1997) Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nature Gen.* **17**: 231-235.
- Cano, MIN, Dungan J, Agabian N, Blackburn EH.** (1999) Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **96**, 3616-3621.
- Cano, M.I.N.** (2001) Telomere biology of trypanosomatids: More question than answers. *Trends Parasitol.*, **17**, 425-429.
- Chandra, A., Hughes, T.R., Nugent, C.I., Lundblad, V.** (2001) Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev.* **15**, 404-414.
- Chappuis, F., S. Sundar, et al.** (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* **5**: 873-82.
- 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**:357-88.
- Chiurillo JM, Beck AE, Devos T, Myler PJ, Stuart K, Ramirez JL.** (2000). Cloning and characterization of *Leishmania donovani* telomeres. *Exp. Parasitol.* **94**, 248-258.
- Chiurillo, M.A., Ramírez, J.L.** (2002) Characterization of *Leishmania major* Friedlin Telomeric Terminus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97**, 343-346.
- Conte, F.F. and Cano M.I.N** (2005). Genomic organization of telomeric and subtelomeric sequences of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *Int. J. Parasitol.* In press.
- Croft, S. L., S. Sundar, et al.** (2006) Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* **19**: 111-26.
- Cruz, A, Coburn, C.M., Beverley, S.M.** (1991) Double targeted gene replacement for creating null mutants *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 7170-7174.
- Cuvillier A, Miranda JC, Ambit A, Barral A, Merlin G** (2003) Abortive infection of *Lutzomyia longipalpis* insect vectors by aflagellated LdARL-3A-Q70L overexpressing *Leishmania amazonensis* parasites. *Cell Microbiol* **5**(10):717-28.
- da Silva MS, da Silveira RCV, Perez AM, Monteiro JP, Calderano SG, Cunha JP, Elias MC, Cano MIN** (2012) Nuclear DNA replication in trypanosomatid protozoa. In: DNA replication and mutation. Ed: Raymond P. Leitner. Nova Science Publishers, Inc NY.
- Degrave, W., Fernandes, O., Campbell, D., Bozza, M., Lopes, U.** (1994). Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review., *Rio de Janeiro*, vol. **89**(3): 463-469

- De lange, T.** (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*, 21: 532-540.
- De Lange, T.** (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Dev.* 19:2100–2110.
- Demitrov, L. N, Brem, R.B, Kruglyak, L Gottschling, D.E.** (1992). Polimorphisms in multiple genes contribute to the spontaneous mitochondrial genome instability of *Saccharomyces cerevisiae* S288C strains. *Genetics*-183, 365-383.
- Duhagon, M. A., Dallagiovanna, B., Ciganda, M., Ruyechan, W., Williams, N., Garat, B.** (2003) A novel type of single-stranded nucleic acid binding protein recognizing a highly frequent motif in the intergenic regions of *Trypanosoma cruzi*. *Bioch and Bioph Res Com*, 309: 183-188.
- Ephrussi, B, Hottinguer, H, Tavlitzi, J.** (1949). Action de l'acriflavine sur les levures. Etude genetique Du mutant petite colonies. *Ann. Inst. Pasteur*, 79-419-450.
- Evans, S. & Lundblad, V.** (1999) Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* 286, 117-120.
- Evans S.K. & Lundblad V.J.** (2000) Positive and negative regulation of telomerase access to the telomere. *J. Cell Sci.* 19, 3357-3364.
- Fernandez, M.F., Castellar, R.R., Conte, F.F., Gozzo, F.C., Sabino, A.A., Pinheiro, H., Novello, J.C., Eberlin, M.N., Cano, M.I.** (2004) Identification of three proteins that associate in vitro with the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* G-rich telomeric strand. *Eur J Biochem*, 271(14):3050-63.
- Funasa, 2002** –Vigilância epidemiológica. <http://www.funasa.br>
- Fu G, Barker DC.** (1998) Rapid cloning of telomere-associated sequence using primer-tagged amplification. *Biotechniques*. 24:386-90.
- Futami, K; Shimamoto, A ; Furuich, Y.** (2007). Mitochondrial and Nuclear Localization of Human Pif1 Helicase. *GeneCare Research Institute Co., Ltd.; 19–2* Kajiwara, Kamakura, Kanagawa 247–0063.
- Futami,K; Goto, H; Shimamoto,K; Watanabe,T e Furuichi, Y.** (2005). Quantitative Analysis of Werner Helicase Activity Using the Single-Molecule Fluorescence Detection System MF10S. *Biol. Pharm. Bull.* 28(1) 9—12.
- Giardini, M.A., Lira, C.B.B., Conte, F.F., Camillo, L.R., Siqueira Neto, J.L., Ramos, C.H.I. Cano, M.I.N.** (2006). The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: gene cloning and characterization. *Parasitol. Res.* 14:1-8.
- Gomes, F ; Tahana, E ; Busso, C ; Kowaltowski, A ; Barros, M .**(2012). nde1 deletion improves mitochondrial DNA maintenance in *Saccharomyces cerevisiae* coenzyme Q mutants.. *Biochemical Journal* (London. 1984) 449, 595-603.
- Gluezn E, Ginger ML, McKean PG.** (2010). Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. *Curr Opin Microbiol* 13:473-9.
- Godoy Hanaoka, S., Nagadoi, A., Yoshimura, S., Aimoto, S., Li, B., de Lange, T., Nishimura, Y.** (2001) NMR Structure of the hRap1 Myb motif reveals a canonical three-helix bundle lacking the positive surface charge typical of Myb DNA-binding domains. *J. Mol. Biol* 312, 167-175.
- Ivens, C.A et al.** (2005). The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. *Science* 309, 436
- Keller, U., Stindl, A.** (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 10612-10620
- Li, B. Oestreich, S., de Lange, T.** (2000) Identification of Human Rap1: Implications for Telomere Evolution. *Cell* 101: 471-483.
- Li, B., Espinal, A. and Cross, G.A.M.** (2005) *Trypanosome* telomeres are protected by a homologue of mammalian TRF2. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5011–5021.
- Lira C.B, Siqueira Neto J.L, Giardini MA, Winck FV, Ramos CH, Cano MI.** LaRbp38: a *Leishmania amazonensis* protein that binds nuclear and kinetoplast DNAs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jul 6;358(3):854-60. Epub 2007 May 8.

- Liu, B, Molina, H, Kalume, D, Pandey, A.** (2006). Griffith, J,D & Englund, P,T; Role of p38 in Replication of *Trypanosoma brucei* Kinetoplast DNA, *Molecular and Cellular Biology*, July 2006, p. 5382–5393
- Makarov, V.L., Lejnine, S., Bedoyan, J., Langmore, J.P.** (1993). Nucleosomal organization of telomere-specific chromatin in rat. *Cell*, 73: 775-787.
- Neves, D.P., Melo, A.L., Genaro, O. & Linardi, P.M.** (2000). *Parasitologia Humana*. 10a Edição, Ed. Atheneu, pp. 31-72.
- Mitton-Fry, R.M., E.M. Anderson, T.R. Hughes, V. Lundblad and D. Wuttke, D.S.** (2002). Conserved structure for single-stranded telomeric DNA recognition. *Science* 296: 145–147.
- Nugent, CI, Hughes, TR, Lue, NF and Lundblad, V.** (1996). Cdc13p: A single strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* 274,249–252.
- Ommena, G., Lorenz, S. and Clos, J.** (2008). One-step generation of double-allele gene replacement mutants in *Leishmania donovani*. *Int. J. parasitol.*
- Ono, Y., Tomita, K., Matsuura, A., Nakagawa, T., Masukata, H., Uritani, M., Ushimaru, T. and Ueno, M.** (2003) A novel allele of fission yeast *rad11* that causes defects in DNA repair and telomere length regulation. *Nucleic Acids Res.* 31, 7141-7149.
- Passos-Silva DG, Rajão MA, Nascimento de Aguiar PH, Vieira-da-Rocha JP, Machado CR, Furtado C** (2010) Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. *J Nucleic Acids* 840768
- Price, C.M., Cech, T.R.** (1987) Telomeric DNA-protein interactions of *Oxytricha* macronuclear DNA *Genes Dev.* 1, 783-793.
- Rey, L.** *Parasitologia*. Editora Guanaba Koogan, Rio de Janeiro, 2001.
- Sbicego, S., Alfonzo, J.D., Estevez, A.M., Rubio, M.A., Kang, X., Turck, C.W., Peris, M., Simpson, L.,** (1987). The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annual Review in Microbiology*, 41:363-82.
- Sbicego S, Alfonzo JD, Estevez AM, Rubio MA, Kang X, Turck CW, Peris M, Simpson L.** (2003). RBP38, a novel RNA-binding protein from trypanosomatid mitochondria, modulates RNA stability. *Eukaryot Cell.* ;2(3):560–568.
- Schramke, V., Luciano, P., Brevet, P., Guillot, S., Corda, Y., Longhese, M.P., Gilson, E & Géli, V.** (2004). RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends. *Nature Gen.* 36, 46-54.
- Schafer F, Buettner G.** (2001). "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple". *Free Radic Biol Med* 30 (11): 1191-212.
- Seifert, K.** (2011). "Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development." *Open Med Chem J* 5: 31-9.
- Shakirov E.V, Surovtseva Y.V, Osbun N, Shippen D.E.** (2005). The Arabidopsis Pot1 and Pot2 proteins function in telomere length homeostasis and chromosome end protection. *Mol Cell Biol.* 25:7725-33.
- Smith, J., Zou, H., Rothstein, R.** (2000). Characterization of genetic interactions with RFA1, the role of RPA in DNA replication and telomere maintenance. *Biochimie* 82, 71-78.
- Smogorzewska, A. & de Lange, T.** (2004). Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu. Rev.*
- Souza, A.E et al.**(2007) Cytotoxic and DNA-topoisomerase effects of lapachol amine derivatives and interactions with DNA. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*.
- Tiuman, T. S., A. O. Santos, et al.** (2011). "Recent advances in leishmaniasis treatment." *Int J Infect Dis* 15(8): e525-32.
- 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.
- Wold, M.S.** (1997). Replication Protein A, a heterotrimeric, ssDNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 61–91.
- WHO Expert Committee.** (1990). Control of the leishmaniasis. World health organization, Geneva. *Technical report Series* ; 793.
- Xin, H; Liu, D; Wan, M; Safari, A; Kim, H; Sun, W; Conner, M.S.O & Songyang, Z.** (2007). TPP1 is a holologue of ciliate TEBP- $\beta$  and interacts with POT1 to recruit telomerase; *Nature* 05469.
- Yu, E.Y., Kim, S.E., Kim, J.H., Ko, J.H., Cho, M.H., Chung, I.K.** (2000). Sequence-specific DNA recognition by the Myb-like domain of plant telomeric protein RTBP1. *J. Biol. Chem.* 275, 24 208 – 24 214.
- Zhang, et.al.**(2006). The human Pif1 helicase, a potential *Escherichia coli* RecD homologue, inhibits telomerase activity. *Nucleic Acids Research*, 2006, Vol. 34, No. 5 1393–1404.
- Zhang B, Zhang AH, Chen L, Xi XG.** (2008). Inhibition of DNA helicase, ATPase and DNA-binding activities of *E. coli* RecQ helicase by chemotherapeutic agents. *J. Biochem.* 143,773-779.