UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE GENE QUE
CONFERE RESISTÊNCIA À TERBINAFINA EM *LEISHMA-
NIA MAJOR*

JULIO FLÁVIO MEIRELLES MARCHINI

Tese de doutorado, apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto, Universidade de São Paulo pa-
ra a obtenção do grau de doutor
em Ciências. Área de concentra-
ção: Biologia Celular e Molecular.

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ RICARDO ORSINI TOSI

RIBEIRÃO PRETO

2008

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luiz Tosi, pela orientação, muita paciência e amizade todos estes anos.

À Prof. Dra. Angela Cruz, por todo seu incentivo, que abriu as portas de seu laboratório para mim até antes de meu ingresso na faculdade,.

Aos colegas de laboratório, Marlei, Fábio, Fabrício, Adriana, Marcelo, Wilton, André, Vinícius, Nilmar e Anderson.

Aos colegas que me ensinaram em minha iniciação científica e até antes, Jerônimo, Liane, André Pedrosa, Simone, Pilar, Pedro e Eliane.

A Viviane, Tânia e Patrícia, por todo auxílio.

Aos meus queridos pais, Rosângela e Sérgio

Aos meus irmãos, Claudia, Rodrigo e Deborah

1. ÍNDICE

1. ÍNDICE	5
1.1. Abreviaturas	7
1.2. Índice de figuras	9
1.3. Índice de tabelas	12
2. RESUMO	13
3. ABSTRACT	15
4. INTRODUÇÃO	17
5. OBJETIVOS	33
6. MATERIAIS E MÉTODOS	34
6.1. Cultura de células e transfecção	34
6.1.1. <i>Leishmania major</i>	34
6.1.2. <i>Escherichia coli</i>	37
6.2. Isolamento de DNA	38
6.3. Isolamento de RNA	39
6.4. Enzimas utilizadas na modificação do DNA	40
6.5. Análise eletroforética	41
6.6. Separação dos cromossomos por eletroforese em gel com campo pulsátil (PFGE)	42
6.7. Transferência de DNA para membranas de náilon (Southern blot)	42
6.8. Transferência de RNA para membranas de náilon (northern blot)	43
6.9. Marcação radioativa de fragmentos de DNA	43
6.10. Hibridação	44
6.11. Reações de transposição	44
6.12. Iniciadores utilizados nas reações em cadeia da polimerase	45
6.13. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	46
6.14. Reação em cadeia da polimerase a partir de colônias (PCR de colônia)	46
6.15. Reação de seqüenciamento	47
6.16. Reação em cadeia da polimerase após transcriptase reversa	47
6.17. Microscopia confocal	47
7. RESULTADOS	49
7.1. Identificação dos genes envolvidos em resistência a terbinafina na região H	49
7.1.1. Divisão do fragmento H4 e subclonagem dos subfragmentos.	53
7.1.1.1. Construção do vetor pELHYG-II	57
7.1.1.2. Análise do subfragmento T4	59
7.1.1.3. Análise do subfragmento T1	62
7.2. Identificação do gene de resistência à terbinafina	63

7.2.1.	Análise <i>in silico</i> das fases abertas de leitura do fragmento T1	71
7.2.2.	Definição do gene que confere resistência à terbinafina através da mutagênese insercional	75
7.3.	HTBF no transcriptoma de <i>L. major</i> e no genoma de <i>Leishmania</i>	83
7.4.	Ensaio para testar hipóteses de mecanismos de resistência	93
7.4.1.	Resistência através da ativação da maquinaria de reparo de membranas	93
7.4.2.	Resistência através da otimização da depleção	97
7.5.	Localização sub-celular do HTBF	101
8.	DISCUSSÃO	105
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
10.	ÍNDICE DE ANEXOS	129

1.1. Abreviaturas

COP - complexo de capa protéica
DEPC - dietilpirocarbonato
dCTP - desoxicitosina trifosfato
dNTPs - mistura de dATP, dCTP, dGTP e dTTP
DHFR-TS - dihidrofolato redutase-timidilato sintetase
DNA - ácido desoxirribonucléico
DL₅₀ - dose letal 50%
EDTA - ácido etilenediamino tetracético
EGTA - ácido etilenoglicol tetracético
g - grama
GAP - proteína ativadora de GTPase
GDI - inibidor de dissociação de GDP
GDP - guanosina difosfato
GEF - fator de troca de guanosina
GFP - proteína fluorescente verde
GTP - guanosina trifosfato
HAART - terapia alta atividade anti-retroviral
HTBF - gene de resistência à terbinafina associada à região H
HYG - gene de resistência à higromicina B
KAN - gene de resistência à kanamicina
kb - 10³ pares de base
L - litro
LB - meio Luria-Bertani
M - molar
mg - miligrama
mL - mililitro
mm - milímetro
mM - milimolar
MRPA - p-glicoproteína A
N - normal
nm - nanômetro
ORF - fase aberta de leitura
pb - pares de base
PCR - reação em cadeia da polimerase
pELHYG - vetor shuttle *E. coli*/L. *major* com marca de resistência à higromicina B.
Número genbank: U84738.
pELHYGII - vetor derivado da combinação do pELHYG com o domínio *polycloning*
do vetor pUC19. Número genbank: EU591704
PFGE - eletroforese em gel com campo pulsátil
pH - potencial de hidrogênio
pSNAR - vetor derivado do pS45NEOA
PTR1 - pteridina redutase
RIME - elemento móvel ribossomal
RNA - ácido ribonucléico
rpm - rotações por minuto
RT-PCR - reação em cadeia da polimerase após ciclo de transcriptase reversa

SF - terbinafina (porção inicial do código do composto: SF86-327)
PQ - primaquina
CQ - cloroquina
SNAP - proteína associada ao sinaptossomo
SNARE - receptor ligante solúvel de fator sensível a N-etilmaleimida
TAQ polimerase - Polimerase proveniente de *Thermus aquaticus*
t-RNA - RNA transportador
TY - meio com triptona e extrato de levedura
UV - ultravioleta
V - volt
YIP - proteína que interage com a YPT
 μ F - microfaraday
 μ g - micrograma
 μ L - microlitro
 μ M - micromolar
 Ω - OHM

1.2. Índice de figuras

Figura 1. Divisão esquemática de passos necessários para efeito de droga em uma célula. Em cinza são mostradas possibilidades de resistência (Borst 1991).	23
Figura 2. Principais vias de tráfego vesicular e capas protéicas associadas (Alberts, Johnson et al. 2002).	24
Figura 3. Biossíntese do ergosterol e colesterol. Os passos finais após a biossíntese do lanosterol foram omitidos, sendo necessários 12 passos adicionais para o ergosterol e 19 passos para o colesterol.	29
Figura 4. Esquema da região H de <i>L. major</i> mostrando os fragmentos H1, H2, H3 e H4. Os retângulos brancos representam genes anotados, os hachurados, as repetições invertidas do grupo RIME3 e os pretos representam as repetições invertidas do grupo RIME6/2/5.	30
Figura 5. (a) Crescimento relativo de diferentes linhagens de <i>L. major</i> na presença de terbinafina. LT252: linhagem selvagem. SF-R30: linhagem resistente à terbinafina. H1 e H4: linhagens transfectadas com diferentes fragmentos da região H. O fator de resistência é calculado pela relação da concentração de droga correspondente ao crescimento de 50% de cada linhagem ou transfectante e a concentração de droga correspondente ao crescimento de 50% da linhagem sensível, LT252. (b) Média e desvio padrão do fator de resistência à terbinafina de diferentes linhagens e transfectantes de <i>L. major</i> . LT252: linhagem selvagem. SF-R30: linhagem resistente à terbinafina. PQ-R10: linhagem resistente à primaquina. H1, H2, H3 e H4: linhagens transfectadas com diferentes fragmentos da região H. *: $p < 0,05$ quando comparado com a linhagem selvagem. **: $p < 0,05$ quando comparado com todas as outras linhagens.	51
Figura 6. (a) Mapa de restrição para a enzima <i>SacI</i> do fragmento H4, mostrando os subfragmentos T1, T2, T4 e as repetições invertidas T3a e T3b. (b) Análise do padrão de restrição de clones obtidos com a ligação do pELHYG-II com um combinado dos fragmentos <i>SacI</i> do H4. Os números 1-12 correspondem aos clones recuperados na transformação.	54
Figura 7. Mapa do vetor pELHYG-II. A região azul em destaque representa o fragmento proveniente do pUC19.	55
Figura 8. (a) Análise da digestão do DNA episossomal obtido de <i>Leishmania</i> transfectante T4 que carrega a construção pELHYG-II::T4. (b) Análise do DNA episossomal originário de <i>Leishmania</i> transfectada com o episossoma pELHYG::T1 por digestão com a enzima de restrição <i>NcoI</i>	60
Figura 9. Média e desvio padrão do fator de resistência à terbinafina em diferentes linhagens e transfectantes de <i>L. major</i> . LT252: linhagem sensível à terbinafina. T4-500: transfectante T4 mantido a 500µg/mL de higromicina B. T1-32 e T1-500: transfectante T1 mantido a 32 e 500 µg/mL de higromicina B respectivamente. H4: transfectante pSNAR-H4. L82-500: transfectante L82-500 (T1-500 após transposição com o GFP-KAN mariner). Curado: T1-500 curado do episossoma pELHYG::T1. *: $p < 0,05$ quando comparado a linhagem selvagem.	61
Figura 10. O transposon GFP-KAN mariner. GFP: proteína fluorescente verde. KAN: gene que confere resistência à kanamicina. Foi retirado o códon ATG iniciador da GFP e desde a extremidade 5' do transposon até o GFP na fase aberta de leitura não existem códons de parada. IR: repetições invertidas.	64
Figura 11. Seqüenciamento do fragmento T1. Na porção superior está representado o mapa de inserções ao longo do fragmento T1. Flechas apontam para a orientação em que se inseriram no inserto. Na porção inferior estão representadas as seqüências obtidas, sua posição e sentido em relação ao T1 e o contig gerado pelo seu alinhamento.	65
Figura 12. Representação das fases abertas de leitura do fragmento T1 (2800pb) por flechas. Quadrados representam trilhas de pirimidinas. AG: Dinucleotídeos AG, sítios de acepção do spliceossoma.	66

Figura 13. Quatro eventos de transposição independentes seqüenciados demonstrando a presença de dez resíduos de timidina na ORF3 do fragmento T1.....	69
Figura 14. Relação entre a ORF3 e a RIME 6/2/5d.....	70
Figura 15. Seqüência predita de aminoácidos da ORF2 do fragmento T1 e alinhamento com proteínas homólogas de outros organismos representativos. Foi destacado em quadrado cinza os sítios definidores do domínio Yip1: DLYGP (posição 53 da proteína de <i>L. major</i>) e GY (posição 117 da proteína de <i>L. major</i>).	73
Figura 16. Representação da seqüência de aminoácidos da ORF2 com as predições de alfa-hélices. Hélices transmembranais: Resíduos 52-73, tamanho (número de resíduos) 22: DWDLWGPFLLCLILASILTINA; Resíduos 84-106, tamanho 23: AVFIFVWLGGVTVNAKLLGSK; Resíduos 126-148, tamanho 23: GALLCCVLPWFLLNLMLCFMAWA; Resíduos 163-185, tamanho 23: SADREVLVVYPVGLFYVFFTWV.....	74
Figura 17. PCR de colônia de uma placa de transposição com o GFP-KAN mariner do T1 utilizando os iniciadores LT007 e LT008. São mostrados dois eventos em que ocorre a inserção do transposon no T1.	77
Figura 18. Padrão predito de hidrofobicidade (Kyte-Doolittle) da proteína potencialmente expressa pela ORF3 e após sua fusão com a GFP na construção F08. O quadrado verde representa predição de uma alfa-hélice transmembranal, composto pelos resíduos SPIALPSFVFFLFVCARISLSVQ.	78
Figura 19. Imagens representativas de visualização <i>in vivo</i> em microscopia de fluorescência confocal, DIC + fluorescência. As duas superiores são do transfectante F08-500 e as duas inferiores do controle, a linhagem LT252. A escala representada é de 5µM.	79
Figura 20. Fator de resistência de <i>L. major</i> da linhagem selvagem LT252 e transfectante F08-500: linhagem transfectada com fragmento T1 do H4 após mutagênese insercional da ORF3. *: significativamente diferente pelo teste "t" de student (p<0,05).	80
Figura 21. Resumo da estratégia de delimitação do HTBF. (A) Quatro fragmentos diferentes do locus H (H1, H2, H3 e H4) foram subclonados no vetor pSNAR e usados em ensaios de resistência à terbinafina. Sinais de negativo e positivo representam sensibilidade ou resistência à droga. (B) Fragmentos SacI do H4 (T1, T2, T3a, T3b e T4) foram subclonados no vetor pELHYG e testados para resistência à terbinafina; S = Sítio SacI. (C) Seqüenciamento de T1 revelou 03 fases abertas de leitura indicadas pelas setas brancas. As flechas representam eventos de transposição tanto no HTBF quanto na ORF3 do transposon GFP-KAN mariner. A inserção 82 que originou o transfectante L82-500 e a inserção F08 que originou o transfectante F08-500 estão relacionados.....	81
Figura 22. Análise do RNA total em diferentes linhagens e transfectantes (sondas utilizadas foram: produto de reação em cadeia da polimerase do HTBF, fragmento Avall do pELHYG e sonda de actina).....	84
Figura 23. Análise do gene HTBF em diferentes espécies de <i>Leishmania</i> . As canaletas contêm DNA genômico separado em eletroforese de campo pulsado e imobilizado em membrana de náilon pela técnica de Southern blot 1: LEM1317 2: LEM1163 3: LEM1958 4: <i>L. major</i> Friedlin 5: <i>L. chagasi</i> 6: <i>L. mexicana</i> 7: <i>L. amazonensis</i> 8: LT252 9: <i>L. braziliensis</i> 10: Lambda ladder PFG marker New England Biolabs®. O cromossomo 23 tem 760kb.	85
Figura 24. Análise do gene HTBF em diferentes espécies de <i>Leishmania</i> . As canaletas contêm DNA genômico digerido pela enzima SacI separado em eletroforese e imobilizado em membrana de náilon pela técnica de Southern blot. 1: <i>L. major</i> Friedlin 2: LT252 (<i>L. major</i>) 3: <i>L. chagasi</i> 4: <i>L. mexicana</i> 5: <i>L. amazonensis</i> 6: <i>L. braziliensis</i>	86
Figura 25. Análise da detecção do transcrito do HTBF. RNA total de linhagens LT252 (coluna 1); SF-R30 (coluna 6) e transfectantes T4-500 (coluna 2); T1-32 (coluna 3); T1-500 (coluna 4) e L82-500 (coluna 5). A porção inferior da figura é uma foto do gel de eletroforese exposta a luz UV e a porção superior corresponde ao sinal da hibridação com uma sonda HTBF. A ponta de seta indica o transcrito de 3,9kb.....	87

Figura 26. Gel de agarose contendo produtos de amplificação da reação de RT-PCR. 1: LT252 2: T4-500 3: T1-500 4: L82-500 5: SF-R30 6: T1-R4 7:L82-R4. (a) Reação com transcriptase reversa. (b) Mesma reação na ausência da transcriptase reversa.....	91
Figura 27. Crescimento da linhagem LT252 de <i>L. major</i> em concentrações crescentes de EGTA. Abscissa em escala decimal até a quebra e escala logarítmica após a quebra.	94
Figura 28. Média e desvio padrão do fator de resistência à terbinafina da linhagem LT252 e transfectante T1-500 na ausência e presença de 1mM de EGTA. *: significativamente diferente pelo teste "t" de Student em comparação à linhagem selvagem ($p < 0,05$).	95
Figura 29. Confirmação do sucesso da co-transfecção do vetor pxMRPA no transfectante T1-500. DNA proveniente do Cotransf 500/8, transformado em <i>E. coli</i> apenas com ampicilina. DNA foi digerido com <i>EcoRI</i> . O gel (coluna da esquerda) foi transferido para membrana de náilon por Southern <i>blot</i> e hibridizado com uma sonda MRPA (coluna da direita).	98
Figura 30. Média e desvio padrão do fator de resistência ao antimonial trivalente das diferentes linhagens e transfectantes. Cotransf 500/8 se refere ao transfectante T1-500 cotransfectado com pxMRPA sendo mantido a 500µg/mL de higromicina B e 8µg/mL de G418. Cotransf 500/96 se refere ao mesmo transfectante após passagens sucessivas em concentrações crescentes de G418 até 96µg/mL. H3(8) se refere ao transfectante pxMRPA em 8 µg/mL.	99
Figura 31. Comparação das fusões com o HTBF. Padrões preditos de hidrofobicidade (Kyte-Doolittle) das proteínas expressas pelo gene HTBF e de sua fusão com GFP. Os quadrados representam predições de alfa-hélices, obtidas pelo sistema SOSUI (Hirokawa, Boon-Chieng et al. 1998). A linha pontilhada no esquema superior representa o resíduo a partir do qual ambas as construções são idênticas. A linha pontilhada no esquema inferior representa o resíduo até o qual ambas as construções são idênticas. Observa-se a perda da maior parte do HTBF na fusão obtida com a transposição e a manutenção quase completa do HTBF na fusão construída.	103
Figura 32. Imagens representativas de visualização <i>in vivo</i> em microscopia de fluorescência confocal, DIC+fluorescência. As duas superiores são do transfectante B05-500 e as duas inferiores do transfectante T1-500-clone 7.	104

1.3. Índice de tabelas

Tabela 1. Amplificação gênica e perfis de resistência a droga em linhagens <i>L. major</i>	27
Tabela 2. Sítios únicos de restrição do vetor pELHYG-II.....	57

2. RESUMO

A amplificação gênica pode ser compreendida como um mecanismo de regulação de expressão protéica em *Leishmania*. A exposição a concentrações não letais de diferentes drogas isoladamente, como o metotrexato, a primaquina, cloroquina e antimônio levam à amplificação de regiões específicas como as localizadas no cromossomo 6 e no cromossomo 23. Essas linhagens tornam-se resistentes a estas drogas e eventualmente apresentam resistência cruzada a outras.

A terbinafina é uma substância sintética utilizada como antifúngico que age pela inibição da esqualeno epoxidase impedindo a síntese de ergosterol, componente da membrana celular de *Leishmania*. A exposição do parasita à terbinafina leva à amplificação da região H. A fragmentação da região H permitiu delimitar a resistência a 2,8 kb; fragmento T1. Por mutagênese insercional o gene de resistência à terbinafina foi definido e nomeado HTBF.

A proteína codificada pelo HTBF possui uma extremidade N-terminal hidrofílica e C-terminal hidrofóbica com quatro alfa-hélices sendo, supostamente, uma proteína integral de membrana. Possui semelhança com a proteína Yip de *Saccharomyces cerevisiae*, que participa do transporte vesicular do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi. O gene HTBF foi detectado em linhagem sensível de *L. major* e de outras espécies de *Leishmania* e seu transcrito em linhagens sensíveis e resistentes de *L. major*.

Levantou-se a hipótese de se tratar de *locus* de resistência a múltiplas drogas já que as regiões amplificadas, mesmo que induzidas por uma determinada droga, podem levar a resistência a outras. A co-transfecção do gene de resistência ao antimonial MRPA no transfectante portador do HTBF levou à diminuição em até cinco

vezes da capacidade de resistência ao antimônio. Apesar dos genes de resistência amplificarem juntos na região H, foi constatado que possuem ação contrária.

Sendo que a terbinafina interfere na integridade da membrana celular, levantou-se hipótese na qual a resistência envolveria o mecanismo de reparo de membrana. A perda do fenótipo de resistência pela falta de cálcio sugerindo a inativação desse mecanismo é um fenômeno previsto corroborando a hipótese.

3. ABSTRACT

“Identification and characterization of a terbinafine resistance gene in *L. major*.”

Gene amplification can be recognized as a protein regulation mechanism in *Leishmania*. Exposure to non-lethal concentrations of different drugs in isolated manner, such as, methotrexate, primaquine, chloroquine and antimony drives the amplification of specific regions. Examples for amplified regions are contained in chromosomes six and 23. The strains become resistant to these drugs and eventually to other drugs as well.

Terbinafine is a synthetic substance used as an antifungal agent. Its mechanism of action is by squalene epoxidase inhibition, blocking ergosterol synthesis, a cell membrane component in *Leishmania*. Parasite exposure to terbinafine elicits H region amplification. H region fragmentation allowed resistance delimitation to 2.8kb, T1 fragment. By insertional mutagenesis terbinafine resistance gene was defined and termed HTBF.

HTBF coded protein has a hydrophilic N-terminal and a hydrophobic C-terminal containing four alpha-helices, putatively, an integral membrane protein. It possesses homology to *Saccharomyces cerevisiae* Yip protein, which takes part in the vesicular transport from the endoplasmic reticulum to Golgi apparatus. HTBF gene was detected in sensitive *L. major* strains and other *Leishmania* species and its transcript was detected in both resistant and sensitive *L. major* strains.

We raised the hypothesis of a multiple drug resistance *locus*, since amplified regions induced by one drug could elicit resistance to a second drug. Co-transfection of MRPA to the HTBF transfectant led to a five-fold decrease to antimonial resis-

tance level. Even though these resistance genes amplify together in the H region, they have antagonizing mechanisms of action.

Since terbinafine action disrupts membrane integrity, we raised a hypothesis in which resistance involves enhancement of membrane repair machinery. Loss of phenotype caused by the lack of calcium suggests the inactivation of this machinery is a predicted phenomenon, corroborating the hypothesis.

4. INTRODUÇÃO

A classificação de microorganismos eucarióticos, dentre os quais a *Leishmania*, apresentou muitas mudanças com a incorporação de informações da biologia molecular, como a ultraestrutura vista em microscopia eletrônica e o seqüenciamento tanto genômico quanto das diferentes classes de RNA. Cavalier-Smith propôs que uma discriminação filogenética mais precisa pode ser alcançada com a utilização de categorias intermediárias: sub-reinos, infrareinos, superfilos, subfilos (Cavalier-Smith 1998). Desta forma, cada uma representaria semelhante diferenciação genética na escala evolucionária dos organismos. Com esta classificação, o parasita do gênero *Leishmania* faz parte da família Trypanosomatidae, ordem Trypanosomatida, classe Kinetoplastea, subfilo Saccostomata, filo Euglenozoa, superfilo Discicristata, infrareino Excavata e sub-reino Biciliata (Dacks e Doolittle 2001; Cavalier-Smith 2003; Keeling, Burger et al. 2005).

A *Leishmania* é um protozoário tripanossomatídeo parasita do homem. A doença, leishmaniose, apresenta diversas formas clínicas desde a tegumentar até a visceral. A leishmaniose é endêmica em oitenta e oito países. A incidência é de 1,0 a 1,5 milhão de casos por ano, sendo 500.000 casos de leishmaniose visceral. A distribuição não é uniforme concentrando 90% dos casos de leishmaniose cutânea em apenas sete países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Peru, Arábia Saudita e Síria e 90% dos casos de leishmaniose visceral em cinco países: Bangladesh, Índia, Peru, Arábia Saudita e Brasil. Salienta-se a presença do Brasil em ambas as listas. A forma visceral tem crescente importância na Europa setentrional (Espanha, sul da França e Itália) especialmente em portadores do vírus da imunodeficiência humana, fato que vem sendo controlado desde 1997 com o uso da terapia combinada de três antiretrovirais, conhecida com HAART (Cruz, Nieto et al. 2006; Malik, John et al.

2006). Uma possível epidemia de leishmaniose em pacientes com HIV no Brasil não ocorreu graças à distribuição gratuita e universal da terapia HAART neste país.

Esta doença é uma antroponose com eventual transmissão ao ser humano, mas com transmissão entre humanos descrita na Índia e Paquistão, principalmente através do vetor (Sundar, Pai et al. 2001) mas com descrição de casos de transmissão por agulha (Cruz, Morales et al. 2002). Possui ciclo biológico heteroxeno, tendo como hospedeiro intermediário os insetos hematófagos dos gêneros *Lutzomyia* ou *Phlebotomus* (mosquito-palha), presentes no novo e velho mundo respectivamente. Os hospedeiros definitivos são mamíferos como roedores, marsupiais, canídeos e outros.

A fêmea do inseto, ao realizar o repasto sangüíneo em um mamífero portador do parasita se infecta pela ingestão de macrófagos contendo a forma amastigota. Durante a passagem pelo trato digestivo, a forma amastigota é liberada dos macrófagos e se diferencia na forma promastigota. Ocorre neste momento multiplicação por divisão binária no sangue em digestão envolto pela membrana peritrófica, secretada por células do estômago do artrópode. Após a digestão do sangue a membrana se rompe e as formas promastigotas ficam livres. Dependendo da espécie da *Leishmania* a diferenciação do parasita ocorre em locais diferentes do inseto (Lainson, Ryan et al. 1987). Aqueles pertencentes ao subgênero *Viannia* colonizam regiões do piloro e íleo (peripilária). No subgênero *Leishmania* a diferenciação ocorre no estômago do artrópode (suprapilária). Ambas se diferenciam em paramastigotas aderidas pelo flagelo ao epitélio intestinal por meio de hemidesmossomos. Multiplicam-se novamente por divisão binária e diferenciam-se em promastigotas, perdendo a capacidade de adesão migrando através do estômago para a faringe do inseto, originando a forma promastigota metacíclica, a qual é infectante. O parasita permanece

no aparelho bucal da fêmea tornando-se capaz de ser inoculado no próximo repasto sangüíneo de seu hospedeiro artrópode. As formas promastigotas metacíclicas são internalizadas por fagócitos mononucleares em uma estrutura denominada fagossomo, que se transforma em fagolisossomo após a fusão com um lisossomo. Em resposta a diferenças de pH e de constituição bioquímica deste novo ambiente se diferenciam em amastigotas. A *Leishmania* sobrevive no fagolisossomo, um ambiente hostil, às custas de mecanismos de evasão da digestão dos macrófagos. Deste modo, o fagolisossomo é conhecido como vacúolo parasitóforo.

Cada espécie de *Leishmania* pode se apresentar preferencialmente como uma ou mais das quatro formas clínicas: cutânea localizada ou difusa, cutaneomucosa e visceral (Gramiccia e Gradoni 2005). A *Leishmania (Leishmania) donovani* e a *L. (L.) chagasi* são responsáveis pelos casos de leishmaniose visceral, sendo que na América Latina a *L. (L.) chagasi* é a principal responsável por esta forma da doença. O cão é o principal reservatório desta espécie em áreas urbanas (Savani, Schimonsky et al. 2003). O caráter rural desta doença tem se modificado com a expansão da zona urbana para estas áreas como resultado de desmatamento e extensão da agricultura. Nestes locais, atingem a vegetação rasteira e mata ciliar, invadindo o nicho do mosquito palha.

As espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) tropica* geralmente são associadas com a forma cutânea localizada mas já foi descrito seu isolamento em pacientes com a forma visceral (Cecil, Goldman et al. 2000). Outras espécies com apresentação clínica cutânea localizada no continente americano são: *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (Viannia) guayenensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) peruviana* e *L. (V.) shawi*. A forma cutânea no resto do mundo é causada pela infecção por *L. (L.) major* e *L. (L.) aethiopica*. As espécies *L. amazonensis*, *L. aethiopica* também

podem causar a forma cutânea difusa. Espécies relacionadas com a forma mucocutânea na América Latina são *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis*.

Em levantamento de 1999 a 2004 no Brasil, a leishmaniose apresentou uma prevalência crescente, sendo que no estado de São Paulo em média foram relatados anualmente 780 casos da forma tegumentar (669 casos em 1999 e 1087 casos em 2003), 80 casos da forma visceral (17 casos em 1999 e 155 casos em 2003), e destes, 10 óbitos (CVE 2005; Divisão de Zoonoses e DIRs VI 2005). O tratamento da leishmaniose é realizado principalmente com o antimonial pentavalente, que apresenta porcentagem de cura de 60 a 90% (Berman 1988; Koff e Rosen 1994; Pastorino, Jacob et al. 2002; Fernandes, Morgan et al. 2004; Name, Borges et al. 2005). Esta droga pode apresentar efeitos adversos como náuseas, vômitos, dor no local de infusão, artralgias, mialgias, pancreatite, leucopenia, hepatite medicamentosa e insuficiência renal aguda (Cuce, Belda Junior et al. 1990). Pode ainda alterar a repolarização cardíaca demonstrada pela eletrocardiografia, por mudanças inespecíficas como alteração do segmento ST, alargamento do QT e inversão da onda T (Berhe, Abraham et al. 2001). Há relatos de alterações mais graves, como *torsade des pointes* e de morte súbita (Ortega-Carnicer, Alcazar et al. 1997; Segura e Garcia-Bolao 1999; Cecil, Goldman et al. 2000). Isto pode dificultar sua utilização especialmente em pacientes idosos ou com co-morbidades (Paula, Sampaio et al. 2003). Outro problema do uso de antimoniais é a resistência a droga já descrita em algumas regiões endêmicas como Índia e Nepal (Croft 2001; Croft, Sundar et al. 2006).

A resistência é observada em laboratório quando o patógeno é submetido a concentrações não letais de diversas drogas. Um dos mecanismos de resistência é a amplificação gênica, meio de preservação celular frente a estímulos negativos, como a ação de substâncias. Neste fenômeno o genoma tem suas proporções rela-

tivas alteradas por meio do aumento de cópias de regiões limitadas do DNA (Beverley 1991). Isto é observado em diferentes espécies de protozoários e até em eucariotos multicelulares em contexto de perda de controle genômico (cultura de células em laboratório ou neoplasia) (Biedler 1992). A amplificação provavelmente possui significado biológico para o organismo além de simples habilitador de resistência a droga, o que possivelmente não justificaria toda uma maquinaria de enzimas para sua execução. A amplificação permite uma diversidade genômica não esperada em organismos assexuados. Este mecanismo poderia ainda fazer parte da regulação da expressão de genes. Os genes de *Leishmania* são transcritos de forma policistrônica, não sendo reconhecidos mecanismos de regulação para a vasta maioria de seus genes (Clayton 2002). A amplificação poderia ser compreendida como um meio para tal.

As regiões amplificadas podem conter genes que codificam proteínas que garantem a sobrevivência. Em neoplasia isto foi caracterizado como um *locus* de resistência a múltiplas drogas, que pode ser acionado inespecificamente em situações de estresse. Nos casos estudados de *Leishmania*, este fenômeno é caracterizado pela formação de moléculas circulares de DNA epissômicos, conforme revisão de Cruz (Cruz e Tosi 1996). Este processo ocorre por intermédio de seqüências repetidas, diretas ou invertidas. Ao parearem-se possibilitam a formação de um *amplicon* circular durante a replicação do DNA (Grondin, Roy et al. 1996). São amplamente encontradas no genoma da *Leishmania* seqüências repetitivas (Ivens, Peacock et al. 2005; Dias, Ruiz et al. 2007; Peacock 2007), mostrando que o processo ocorre potencialmente em várias regiões do genoma, pressupondo a existência de uma maquinaria de regulação. No entanto, nada que elucidasse este mecanismo foi identificado.

Para interferir na multiplicação de um patógeno, uma droga deve ser capaz de atravessar a membrana, tornar-se ativo, encontrar o seu alvo intracelular, e provocar o dano celular propriamente dito. Além disso, o efeito deverá ser suficiente para que o patógeno seja eliminado pela ação direta da droga, tenha sua replicação inibida, ou torne-se susceptível ao sistema imunológico do hospedeiro ou finalmente, uma combinação desses efeitos. A resistência a uma droga consiste em deter sua ação em algum dos passos acima, por exemplo pelo impedimento da captação da droga, de sua permanência no intracelular ou de sua ativação, como está representado na Figura 1. A resistência pode levar ainda a ocupação do sítio ativo da droga por outra proteína, alteração do alvo da droga, ou aumento do reparo do dano causado (Borst 1991). A elucidação dos mecanismos da amplificação gênica possibilitaria não apenas o desenvolvimento de estratégias mais eficientes no tratamento da leishmaniose, como também de diversas infecções cujos patógenos são capazes de adquirir resistência a drogas por mecanismos similares.

Figura 1. Divisão esquemática de passos necessários para efeito de droga em uma célula. Em cinza são mostradas possibilidades de resistência a droga (Borst 1991).

Figura 2. Principais vias de tráfego vesicular e capas protéicas associadas (Alberts, Johnson et al. 2002).

Alterações no sistema de transporte celular podem se estabelecer para o desenvolvimento de resistência a droga, tanto na diminuição da captação, quanto na sua depleção ativa. Este sistema é composto por um conjunto de maquinarias protéicas e as vesículas membranais dirigidas por estas. Pode ser dividido nas fases de brotamento vesicular, cisão, transporte da vesícula, atracamento e fusão vesicular. O brotamento ocorre pela ativação de capas protéicas de diferentes tipos: clatrina, COPI e COPII (Figura 2). Cada uma destas possui especificidade para determinadas vias intracelulares. A ativação ocorre por meio de proteínas Rab/Ras como a Sar1 que desencadeia o recrutamento da cascata de transporte envolvendo proteínas selecionadoras de conteúdo vesicular (receptoras de cargo) e transmembranais, proteínas da capa e proteínas definidoras do alvo vesicular. Um segundo conjunto de proteínas está envolvido no direcionamento da vesícula e na regulação do tráfego, dentre as quais existem as proteínas SNAP, SNARE, Rab e proteínas que interagem com as Rab.

Em *Saccharomyces cerevisiae* foram identificadas as primeiras proteínas Rab: Sec4 e Ypt1 (Gallwitz, Donath et al. 1983). Outras seis foram identificadas, sendo que uma tem duas isoformas e outra tem três isoformas, com um total de 11 proteínas Rab (Lazar, Gotte et al. 1997; Buvelot Frei, Rahl et al. 2006).

O modelo atual (Novick e Zerial 1997) das proteínas Rab é definido como um ciclo entre a membrana doadora e receptora e a volta pelo citosol. Sofrem uma transformação pós-traducional. São adicionados dois grupos geranylgeranyl que permitem a sua associação à membrana. Em sua forma citosólica e inativa a proteína Rab-GDP fica ligada a GDI (*GDP-dissociation inhibitor*), que esconde seus grupos hidrofóbicos. Quando a Rab migra pelo citosol de volta à membrana doadora um fator de dissociação de GDI (GDF) promove a separação da Rab do GDI e a in-

serção dos grupos geranylgeranyl na membrana. Concomitante, a Rab sofre a troca de GDP por GTP estimulada por um fator de troca de guanosina (GEF). O brotamento vesicular ocorre e a vesícula migra pelo citoplasma por trilhos de microtúbulos até seu destino. A Rab participa então do atracamento com a membrana alvo, sendo ativada por uma proteína ativadora de GTPase (GAP), servindo de plataforma para a interação das proteínas SNARE pela hidrólise de seu GTP. O ciclo se reinicia já que a Rab após a hidrólise volta a ter afinidade pelo GDI e se dissocia da membrana.

Inicialmente o tratamento da leishmaniose era realizado com o antimonial trivalente. Seu uso foi substituído pelo pentavalente por apresentar menor toxicidade (Rey 2001; Veronesi e Focaccia 2002). Até o momento, a forma de ação dos antimoniais na *Leishmania* não foi elucidada. O antimonial é capaz de atingir o parasita entrando no fagócito e seu fagolisossomo. O efeito microbicida é exercido na forma trivalente do antimonial. A conversão ocorre tanto no fagócito, quanto na forma amastigota do parasita (Serenio, Cavaleyra et al. 1998; Brochu, Wang et al. 2003). Observa-se a fragmentação do DNA em um processo semelhante a apoptose. Supõe-se que isto seja causado pela ação da droga, levando a dano direto do DNA e diminuindo a síntese de desoxirribonucleotídeos impedindo a replicação e o reparo de DNA (Wyllie, Cunningham et al. 2004). Finalmente, com acúmulo de múltiplos erros no genoma a apoptose seria desencadeada.

A exposição a algumas drogas em *Leishmania*, como as apresentadas na Tabela 1, resultam em amplificação gênica. Entre as amplificações conhecidas podemos citar, a região R que contém o gene *DHFR-TS* e confere resistência ao metotrexato (Beverley, Coderre et al. 1984); e a região H, um *locus* de 45kb localizado no cromossomo de 760kb deste parasita (Figura 4), cuja amplificação já foi associada à

resistência à terbinafina. Na região H foram isolados e caracterizados os genes *P-TR1* (Callahan e Beverley 1992), responsável por resistência a metotrexato, e o gene *MRPA* (Callahan e Beverley 1991) responsável por resistência a antimoniais. Estão presentes ainda o gene triptofanil t-RNA sintetase (Augusto, Squina et al. 2004) e a fase aberta de leitura LmF23.0290 (LmHUS1) que codifica a proteína HUS1 de *Leishmania* (Nunes, VS e Tosi, LRO; resultados não publicados).

Tabela 1. Amplificação gênica e perfis de resistência a droga em linhagens *L. major*

Linhagem	No. de cópias ^a		Aumento de resistência ^b		
	R	H	Metotrexato	Primaquina	Terbinafina
LT252	1	1	1	1	1
PQR30	1	40	23±11*	2.0±0.2***	1.5±0.2***
SFR30	1	40	12±1.4***	1.3±0.1*	4.4±0.6**
R1000-5B	100	50	4600±380***	1.3±0.1***	1.3±0.1***
C10-R10	1	1	57±7.8***	0.9±0.1	1.1±0.1
CQR30	1	1	1.0±0.3	1.0±0.1	2.9±0.2***

^aNúmero de cópias das regiões R e H em cada uma das linhagens.

^bO aumento de resistência é a proporção da concentração da droga que diminui o ritmo de crescimento celular por 50% de cada linhagem e a linhagem LT252, medidos no mesmo experimento. Valores significativamente diferentes do selvagem (com aumento de resistência 1) pelo teste "t" de Student são designados por asteriscos (* p<0.05; ** p<0.02; *** p<0.01) (Hennekens, Buring et al. 1987).

A transfecção estável (Kapler, Coburn et al. 1990), nocaute genético (Cruz e Beverley 1990) e a transposição (Tosi e Beverley 2000) são ferramentas que permitem estudos de genes isolados em *Leishmania*, que possibilitou a identificação dos genes *PTR1* e *MRPA* presentes na região H (Callahan e Beverley 1991; Callahan e Beverley 1992).

O gene *PTR1* codifica a pteridina redutase 1, que é um dos genes responsável por mediar a resistência ao metotrexato. Possui a capacidade de reduzir pteridinas e folatos e quando superexpressa, torna-se capaz de reduzir dihidrofolato em tetrahydrofolato em quantidades suficientes para a resistência à inibição da dihidrofo-

lato redutase (DHFR-TS), como a provocada pelo metotrexato (Bello, Nare et al. 1994). Adicionalmente foi demonstrado que níveis intracelulares de biopterina são moduladores negativos no processo de metaciclo gênese nestes parasitas participando, portanto, na virulência (Cunningham, Titus et al. 2001). A diminuição da virulência associada à superexpressão de PTR1 pode atuar no aumento da sobrevivência do hospedeiro e conseqüentemente transmissão parasitária, representando uma classe de genes que limitam a virulência. (Levin 1996).

Uma outra superfamília de genes, os transportadores ABC, incluem pelo menos duas famílias de genes de resistência a droga. As p-glicoproteínas, agem por um mecanismo dependente de ATP possivelmente levando a extrusão de drogas citotóxicas. Estas proteínas agem de maneira inespecífica, interagindo com uma variedade de componentes como quimioterápicos, pesticidas, imunossupressores e drogas glicosiladas (Schinkel 1997). Em *Leishmania* foi observada a relação do gene *MRPA* com a resistência ao arsenato e antimonial. A proteína MRPA está associada a membranas intracelulares que fazem parte de vias exo e endocíticas (Legare, Richard et al. 2001). Hipoteticamente, a MRPA seqüestra o antimonial conjugado a tióis para vesículas direcionadas a exocitose pela bolsa flagelar (Grondin, Haimeur et al. 1997; Ouellette, Drummelsmith et al. 2004). Uma segunda família de genes de resistência pertencentes à mesma superfamília inclui a proteína PRP1, proteína de resistência a pentamidina 1, que também se localiza no túbulo multivesicular e é inibido por verapamil, sugerindo o mesmo mecanismo de resistência da proteína MRPA consistindo no seqüestro da droga em vesículas direcionadas a exocitose pela bolsa flagelar (Coelho, Yamashiro-Kanashiro et al. 2006).

Figura 3. Biossíntese do ergosterol e colesterol. Os passos finais após a biossíntese do lanosterol foram omitidos, sendo necessários 12 passos adicionais para o ergosterol e 19 passos para o colesterol (Leyden 1998).

Figura 4. Esquema da região H de *L. major* mostrando os fragmentos H1, H2, H3 e H4. Os retângulos brancos representam genes anotados. Os retângulos hachurados as repetições invertidas do grupo RIME3 e pretos representam as repetições invertidas do grupo RIME6/2/5.

Das drogas que elicitam a amplificação gênica da região H, o metotrexato e o antimonial já tiveram genes identificados que conferem esta resistência. A resistência a terbinafina em *Leishmania* também é associada a amplificação da região H e não tem um gene associado a esta resistência. Esta droga é utilizada no tratamento antifúngico e age inibindo a esqualeno epoxidase. Esta enzima faz parte de biossíntese do ergosterol e colesterol (Figura 3), convertendo esqualeno em 2,3-oxidoesqualeno (Leyden 1998), componente importante da membrana celular. Em levedura a morte celular decorre tanto da deficiência de ergosterol quanto do acúmulo de altos níveis de esqualeno intracelular (Ryder 1992). Em *L. braziliensis*, derivados do ergosterol (14-desmetil) compõem cerca de 70% dos esteróis da membrana celular, e na presença de 1µM de terbinafina este índice cai para 27% enquanto que a composição de esqualeno aumenta de 20% para 70% (Rangel, Dagger et al. 1996). A *Leishmania* selvagem é sensível à terbinafina, mas em doses baixas é capaz de elicitar a amplificação gênica, como evidenciado na Tabela 1 pela linhagem SF-R30 (Ellenberger e Beverley 1989).

Durante os estudos que identificaram os genes *PTR1* e *MRPA* foram gerados fragmentos da região H clonados no vetor pSNAR. Este é um exemplo de um vetor *shuttle*, capaz de se replicar tanto em bactéria quanto no parasita com a marca de resistência para neomicina (G418). Esses plasmídeos contendo toda a extensão da região H conforme pode ser visto na Figura 4, foram denominados pSNAR-H1 a pSNAR-H4 (Callahan e Beverley 1992).

Considerando a resistência à terbinafina, sua correlação com a amplificação gênica da região H, o estudo de resistência a droga, de amplificação gênica e de compreensão do mecanismo de resistência, foram iniciados experimentos para tes-

tar a hipótese de que haveria um gene presente na região H que capacitaria a *Leishmania* à resistência à terbinafina.

5. OBJETIVOS

- ◆ Identificação e isolamento do gene que confere resistência à terbinafina em *Leishmania major*.
 - Delimitar a região de DNA capaz de levar a resistência por meio de ensaio de resistência.
 - Seqüenciar o subfragmento delimitado utilizando ilhas de transposon.
 - Interromper fases abertas de leitura identificadas no seqüenciamento utilizando transposição para gerar mutagênese insercional.
- ◆ Determinação das características do produto deste gene.
 - Estudar sua localização subcelular utilizando transposição para gerar fusão do gene de interesse com proteína GFP.
 - Elaborar hipóteses para o mecanismo de resistência e testá-las.
 - Caracterizar a homologia do gene entre diferentes espécies e número de cópias no genoma.
 - Caracterizar a expressão do gene em linhagens/transfectantes sensíveis e resistentes.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Cultura de células e transfecção

6.1.1. *Leishmania major*

A linhagem selvagem utilizada como base para as transfecções e como referência negativa foi a linhagem avirulenta LT252, clone CC1 - LT252 - MHOM/IR/84/LT 252 (Kapler, Coburn et al. 1990; Callahan e Beverley 1991). Foram utilizadas também as linhagens referências: *L. major* LEM1958 (MHOM/-YE/78/LEM62cl1958) e *L. infantum* LEM1163 (MHOM/FR/78/LEM75cl1163) e LEM1317 (MHOM/FR/82/LEM356cl1317) (Wincker, Ravel et al. 1997). A comparação com diferentes espécies de *Leishmania* foi realizada com as seguintes linhagens: *L. major* "Friedlin" (MHOM/IL/81/FRIEDLIN), *L. chagasi* (MHOM/BR/74/M2682), *L. mexicana* (MNYC/BZ/62/M379), *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/2269), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/2904).

O parasita foi cultivado em meio líquido M199 (Gibco®). Este foi suplementado com soro fetal bovino [10%], hepes pH 7,5 [0,04M], adenina [0,1mM], biotina [50µg/mL], hemina [250µg/mL], penicilina [50U/mL] e estreptomicina [50µg/mL]. As culturas foram mantidas a 26°C. As drogas necessárias para manutenção dos episomas, G418 e higromicina B, foram adicionadas nas concentrações recomendadas (Callahan e Beverley 1991; Garraway, Tosi et al. 1997), ou conforme descrito nos experimentos. O isolamento dos transfectantes foi realizado em meio semi-sólido, o qual era obtido com meio M199 2x, aquecido e misturado na proporção 1:1 a uma solução de agar nobre [2,0%] fundida suplementado com biopterina [500µg/mL]. A-

pós era colocada em uma placa de Petri e deixada por 16 horas desidratando (Kapler, Coburn et al. 1990).

A densidade de parasitas em suspensão era determinada pela contagem em câmara de Neubauer. Nos ensaios de resistência a droga, as culturas eram diluídas no ponto inicial para $1 \cdot 10^5$ células. Diariamente os poços do ensaio mantidos sem drogas eram recontados. Quando atingiam entre $0,8 \cdot 10^7$ a $1,2 \cdot 10^7$, ou seja, a fase logarítmica tardia de crescimento, a contagem de todos os poços era realizada. A quantidade estimada de droga que permite o crescimento de 50% dos parasitas em relação à cultura sem droga era chamada de DL_{50} . Determinada utilizando os dois pontos mais próximos da inibição de 50% da taxa de crescimento do protozoário para aquela droga.

As linhagens resistentes foram obtidas a partir do incremento de 100% da droga em passagens sucessivas da cultura quando atingia a fase logarítmica tardia.

Para o estudo do HTBF no genoma de *L. major* e outras espécies de *Leishmania*, o DNA genômico de cada espécie era armazenado em *plugs*. Quando a cultura atingia a fase logarítmica de crescimento, as células eram precipitadas por centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em meio M199 conforme descrito acima, com exceção do soro fetal bovino de forma a obter uma concentração final de $2 \cdot 10^8$ parasitas/mL. Uma solução de agarose *Low Melting Point* [2%] fundida era diluída 1:1 a uma solução de PSG 2X (NaCl [130mM]; Na_2HPO_4 [142mM]; NaH_2PO_4 [8mM]; glicose [2%]). A suspensão de promastigotas era diluída com o mesmo volume de uma solução PSG/agarose. Cada 63µL desta solução eram distribuídos em poços de uma placa de acrílico. Blocos de agarose eram obtidos na retirada do molde, sendo mantidos por 48 horas em uma solução de lise (EDTA [0,5M], pH 9,0; SDS [1%]; proteinase K [0,5mg/mL]) a 42°C. Em seguida os

blocos eram lavados por 48 horas com solução TE (tris-HCl [200mM]; EDTA [100mM]). As soluções eram trocadas a cada 24 horas. Após a última troca os blocos eram estocados na solução TE a 4°C (Beverley 1988).

Utilizou-se o método de transfecção de DNA por eletroporação (Kapler, Couburn et al. 1990). $4 \cdot 10^7$ células na fase logarítmica tardia foram lavadas em tampão de eletroporação (hepes [21mM], NaCl [137mM], KCl [5mM], Na_2HPO_4 [0,7mM], glicose [6mM], pH 7.5), ressuspendidas em 0,4mL (para uma concentração final de $1 \cdot 10^8$) e mantidas em gelo. As amostras de DNA foram purificadas por coluna QIAGEN® e a quantidade de DNA utilizada foi de 20 a 40 µg por transfecção. À suspensão de células foi adicionado o DNA e a mistura transferida para cubeta de eletroporação. Para a transfecção, utilizou-se o Gene Pulser™ (BioRad®) e o módulo extensor de capacitância. O pulso realizado foi de 500µF e 4,5V em uma cubeta de 2mm. As células foram mantidas em gelo por 10 minutos e recuperadas em 10mL de meio M199. Após incubação de 24 horas a 26°C, as células foram coletadas e plaqueadas em meio semi-sólido acrescido de bioterina [500µg/mL] e a droga de seleção cujo gene de resistência estava no DNA transfectado. A concentração da droga (em µg/mL) usada na seleção do transfectante está indicada em sobrescrito. Os transfectantes foram nomeados conforme convencionado (Clayton, Adams et al. 1998).

Para o processo de curar o transfectante de seu epissoma, este era cultivado 20 passagens sucessivas em meio sem droga de seleção até a concentração de $1 \cdot 10^7$ e diluído para $1 \cdot 10^5$, equivalente a 140 duplicações. Em seguida, a linhagem era diluída a 0,9 parasitas por 100µL em placa de 96 poços com 100µL. Em uma duplicação da placa era adicionada a droga de seleção. Os poços com crescimento de parasita sem droga, mas que não tinha crescimento correspondente na placa com droga eram considerados curados.

6.1.2. *Escherichia coli*

A bactéria utilizada nos experimentos foi: DH10B F^- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80d/lacZ Δ M15 Δ /lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ (ara,leu)7697 galU galK λ^- rpsL nupG.

O meio LB foi utilizado para cultivo bacteriano (extrato de levedura [0,5%], triptona [1,0%], NaCl [1,0%]). O meio LB semi-sólido consiste no meio LB adicionado de agar bacteriológico [1,5%].

Os antibióticos necessários para seleção de transformantes, higromicina B e ampicilina, foram utilizados na concentração de 100 μ g/mL e kanamicina na concentração de 30 μ g/mL.

Para obtenção de células eletrocompetentes uma colônia de *E. coli* era inoculada em 2mL de meio LB e incubada sob agitação constante a 37°C por 14 a 16 horas. Este volume era então transferido para 500mL de meio TY (triptona [2%], extrato de levedura [0,5%]) e novamente incubado a 37°C sob agitação constante até que as células atingissem densidade óptica máxima de 0,4 em comprimento de onda de 600nm. As células eram resfriadas em banho de gelo por 20 minutos, distribuídas em frascos gelados e centrifugadas sob refrigeração a 2°C, 4000g por 20 minutos. O sedimento era lavado duas vezes no mesmo volume de água deionizada esteril e gelada, nas mesmas condições de centrifugação. Depois era novamente lavado duas vezes em 30mL de glicerol [10%] (v/v em água), sendo ressuspendido em um volume aproximado de 0,5mL, distribuído em alíquotas de 40 μ L e congelado a -70°C (Garraway, Tosi et al. 1997).

A transformação foi feita usando as células eletrocompetentes preparadas conforme protocolo descrito. Quarenta microlitros da bactéria foram misturados com o DNA a ser transformado e submetidos a eletroporação de 2.5V a 250Ω em um aparelho Gene Pulser® – Biorad®. Em seguida foram colocados em 2mL de meio LB em baiana para recuperação das células por 1 hora e então plaqueadas em meio semi-sólido também contendo as drogas de seleção (Sambrook, Fritsch et al. 1989).

6.2. Isolamento de DNA

DNA plasmidial era obtido através do método de lise alcalina (Birnboim e Doly 1979). Amostras de 2 a 50mL de meio LB com a bactéria portadora do epissoma de interesse eram cultivadas por 16 horas, com agitação e temperatura constantes. Em seguida a amostra era centrifugada por 2 minutos a 2000rpm e o sobrenadante descartado. As células eram ressuspensas em meio residual. Adicionava-se solução de ressuspensão (glicose [50mM]; tris-HCl [25mM], pH 8,0; EDTA [10mM], pH 8,0) e a seguir solução de lise (NaOH [0,2N] e SDS [1,0%]). A mistura era invertida 6 a 8 vezes sem vibração intensa, que poderia quebrar o DNA genômico. Na sequência era adicionada solução neutralizante (acetato de potássio [3M], ácido acético glacial [11,5%](v/v)). O *debris* celular e o DNA genômico eram precipitados pela centrifugação a 13500 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante contendo o DNA epissomal era transferido para outro tubo e misturado com um volume igual de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção 25:24:1. Este passo, pelo grau de pureza alcançado, melhora a ação de enzimas modificadoras e a ligação do DNA obtido no final do processo. A fase aquosa era novamente extraída por centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos. Finalmente o DNA era precipitado da fase aquo-

sa pela adição de dois volumes de etanol [100%] a 0°C, que era deixada por 16 horas a 0°C, 2 horas a -20°C ou 15 minutos a -70°C. O sal residual era lavado com etanol [70%] a 0°C. O DNA final era ressuspensionado em água deionizada tratada com osmose reversa (Milli-Q®) ou em TE (tris-HCl [10mM], pH: 7,4; EDTA [1mM]) com RNase A [10µg/mL] e mantido a 4°C para uso a curto prazo ou estocado a -70°C (Sambrook, Fritsch et al. 1989).

Fragmentos de DNA foram purificados a partir de géis de agarose utilizando o kit de extração QIAEX II® (QIAGEN®). A banda de DNA era localizada no gel por coloração por brometo de etídio e exposição a ultravioleta. Esta foi recortada do gel. Procedia-se com a solubilização da agarose (tampão QX1 e composto QIAEX® do kit) e incubação a 50°C por 10 minutos. O composto QIAEX® tem partículas de sílica-gel, com ação de adsorção do DNA em pH 7,5 e alta concentração de sal. Com a centrifugação o DNA ficava no precipitado da solução e os fragmentos de agarose no sobrenadante, que era desprezado. O DNA era então liberado pela ressuspensão com uma solução com baixa concentração de sal.

6.3. Isolamento de RNA

O RNA total era extraído de formas promastigotas das linhagens de *L. major* em fase log tardia de crescimento em meio de cultura M199 completo usando o kit Trizol® e seguindo as orientações do fabricante (GIBCO BRL®) (Chomczynski e Sacchi 1987). Um volume de suspensão de promastigotas que fornecesse aproximadamente $1,0 \cdot 10^7$ células era centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C, ressuspensionado em 1,0mL de Trizol® e homogeneizado por inversão. Após incubação das amostras por 5 minutos a temperatura ambiente eram adicionados 0,2mL de

clorofórmio. Os tubos eram agitados manualmente por 15 segundos, incubados por 2 a 3 minutos a 15 a 30°C e centrifugados a 12000g por 15 minutos a 4°C. A precipitação do RNA total era realizada adicionando-se 0,5mL de isopropanol ao tubo, centrifugado a 7500g por 5 minutos a 4°C. O precipitado era ressuspendido em água Milli-Q® tratada com DEPC [0,1%] (dietilpirocarbonato) e alíquotas de 2µL eram utilizadas para quantificação em espectrofotômetro.

6.4. Enzimas utilizadas na modificação do DNA

Foram usadas enzimas de restrição e de modificação de DNA da New England Biolabs® e Gibco BRL® nas condições especificadas pelos fabricantes.

A extremidades dos fragmentos de DNA eram modificadas com as enzimas *large fragment of klenow* (New England Biolabs®), tampão: tris-HCl [10mM], NaCl [50mM], MgCl₂ [10mM] ou *mungbean* nuclease (New England Biolabs®), tampão: acetato de sódio [50mM], NaCl [10mM], ZnSO₄ [1mM]. A klenow tem ações exonuclease 3'-5' e polimerase. Esse processo necessita da presença dos quatro nucleotídeos em solução, mas pode ser realizada de maneira parcial se um dos nucleotídeos for omitido. Se realizado de maneira completa torna a extremidade coesiva em aparada, com ganho de nucleotídeos no lado 5'. A mungbean nuclease tem ação exonuclease 3'-5' e 5'-3', tornando extremidades coesivas em aparadas com perda de nucleotídeos em ambas as extremidades.

Para desfosforilação dos vetores utilizou-se a fosfatase alcalina bacteriana – Roche® (tampão: tris-HCl, pH 7,5 [10mM], MgCl₂ [10mM]) ou a fosfatase alcalina de camarão – Invitrogen® (tampão: tris-HCl, pH 7,5 [10mM], MgCl₂ [10mM], BSA [0,1mg/mL]).

As ligações foram feitas entre o vetor e os fragmentos de DNA em uma proporção 10:1 em extremidades picomoles. A reação consistia ainda de 5 unidades de T₄ DNA ligase (Roche®) em tampão de ligação 10x fornecido pelo fabricante em um volume final de 20µL. A reação era mantida por 2 horas a 37°C, caso as extremidades fossem coesivas, ou por 16 horas a 14°C, caso uma extremidade fosse aparada. A seguir adicionava-se solução contendo proteinase K para terminar a reação e tRNA para facilitar a precipitação do DNA.

Para digestão do DNA genômico do parasita, blocos de agarose foram lavados duas vezes em TE (tris-HCl [10,0mM] e EDTA [1,0mM]), uma vez em TE contendo PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonato [1,74mg/mL] dissolvido em isopropanol) e duas vezes no tampão adequado à enzima de restrição. A seguir eram adicionadas 40 unidades da enzima de restrição por bloco de agarose em um volume de 300µL e a solução incubada a 37°C por 14 a 18 horas.

6.5. Análise eletroforética

Análises de ácidos nucléicos foram feitas por eletroforese em gel de agarose [0,8% a 1,5%] preparado em tampão TAE (tris-acetato [40mM], EDTA [1mM]). A concentração do gel varia conforme o tamanho de DNA de interesse. Géis mais concentrados permitem uma melhor separação de DNA de menor tamanho. As eletroforeses foram realizadas neste mesmo tampão a temperatura ambiente. Corou-se os géis com brometo de etídio [0,5 mg/L] em água por 20 minutos e estes foram observados em transiluminador UV. Os pesos moleculares utilizados foram lambda *Hind*III e 1 kb DNA ladder (GIBCO®). O lambda *Hind*III produz as bandas de 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 e 125 pares de base. O 1 kb dna ladder (GIBCO)

produz as bandas de 12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018 e 506 pares de base.

6.6. Separação dos cromossomos por eletroforese em gel com campo pulsátil (PFGE)

O PFGE permite a separação dos cromossomos graças a aplicação de pulsos alternados de corrente por várias horas (Schwartz e Cantor 1984; Giannini, Schittini et al. 1986). Utilizou-se o aparelho CHEF MAPPER (Biorad®) e as seguintes condições de corrida para separação dos cromossomos na faixa de 200-1000kb: tempo de corrida de 29 horas e 57 minutos, pulso inicial de 24 segundos, pulso final de 1 minuto e 33 segundos a 4,5V/cm. O gel foi preparado com agarose [1%] e a solução TBE 0,5X (tris [45mM]; ácido bórico [45mM]; EDTA [1mM]). Os blocos de agarose descritos acima eram alocados no gel, o qual ficava embebido em solução de TBE mantida a 14°C.

O marcador utilizado foi o Lambda Ladder PFG Marker da New England Biolabs®, que é composto pelos seguintes fragmentos (em kb): 48,5; 97,0; 145,5; 194,0; 242,5; 291,0; 339,5; 388,0; 436,5; 485,0; 533,5; 582,0; 630,5; 679,0; 727,5; 776,0; 824,5; 873,0; 921,5; 970,0; 1018,5.

6.7. Transferência de DNA para membranas de náilon (Southern blot)

O DNA separado por eletroforese pelos géis descritos acima poderia ser transferido para membrana de náilon. O gel era lavado uma vez em solução depurificante (HCl [0,2N]) por 15 minutos, duas vezes por 15 minutos em solução desnaturante (NaCl [1,5M]; NaOH [0,5M]) e duas vezes por 15 minutos em solução neutra-

lizante (tris-HCl [0,5M], pH 7,0; NaCl [1,5M]). A transferência era obtida pela capilaridade. O gel era colocado sob a membrana de náilon e uma pilha de papéis toalha e um peso de 0,5kg. Abaixo do gel era colocado papel 3M embebido em SSPE 1X (NaCl [1,5M]; NaH₂PO₄ [100mM]; EDTA [10mM], pH 7,4) cujas extremidades eram mergulhadas em poços contendo a mesma solução. Após 12 a 24 horas a membrana de náilon era levada à exposição a luz ultravioleta por 2 minutos para fixar o DNA ao polímero do náilon (Southern 1975).

6.8. Transferência de RNA para membranas de náilon (*northern blot*)

Alíquotas contendo 10µg de RNA total foram equilibradas em formamida, formaldeído e tampão MOPS (ácido 3-(*N*-morfolino) propansulfônico [0,02M]; acetato de sódio [8,0mM] e EDTA [1,0mM]) para serem desnaturadas a 95°C por 3 minutos. Foram fracionadas em gel 0,8% de agarose com formaldeído [2,2M] e MOPS 1X. O tampão da eletroforese também consistia em MOPS 1X. A transferência de RNA para membranas de náilon foi feita com tampão SSPE 10X de forma semelhante ao Southern *blot* (Sambrook, Fritsch et al. 1989).

6.9. Marcação radioativa de fragmentos de DNA

Para marcação radioativa do DNA foi empregado α -P³²-dCTP. A citosina radioativa é incorporada ao DNA pela técnica de *random priming* (Feinberg e Vogelstein 1983) que consiste na utilização de todos os iniciadores possíveis de 6 bases (4096 possibilidades) e uma reação em cadeia de polimerase com adenosina, guanosina e timidina ordinárias adicionadas à citosina radioativa. As amostras marca-

das foram purificadas dos nucleotídeos não incorporados que permaneciam na solução (nucleotídeos, iniciadores) por Sephadex H50.

6.10. Hibridação

O método foi revisado por Vandenplas (Vandenplas, Wiid et al. 1984). As membranas de náilon eram incubadas em 20mL de uma solução de pré-hibridação (SSPE 2X; SDS [0,5%]; ficoll [0,1%]; polivinil-pirrolidona (PVP) [0,1%]; soroalbumina bovina (BSA) [0,1%] e DNA de esperma de salmão [100µg/mL]) por 4 horas a 67°C (Sambrook, Fritsch et al. 1989). A hibridação com a sonda radioativa era realizada incubando-a por 16 horas a 67°C em 10mL de solução de hibridação (SSPE 2X; SDS [0,5%]; ficoll [0,02%]; SSA [0,02%]; e DNA de esperma de salmão [100µg/mL]). Após a hibridação as membranas eram lavadas para remover as ligações inespecíficas da sonda com o DNA/RNA da membrana de náilon. Quanto maior o número de lavagens e quanto mais alta a sua temperatura das lavagens realizadas, maior a estringência do resultado da hibridação, ou seja, mais específica é necessária ser a complementação da sonda com o DNA/RNA da membrana de náilon para que não seja lavada da membrana. O protocolo consistia em quatro lavagens de solução SSPE 2X e SDS [0,5%] aquecidas a 67°C. A membrana final com a sonda incorporada era exposta a filme auto-radiográfico (Kodak® TMG-1) a -70°C por 24 horas. Sinais fracos podiam eventualmente ser expostos por tempos mais prolongados, ou vice-versa, já que a exposição no filme é cumulativa.

6.11. Reações de transposição

A reação foi feita com 1,0µg do DNA alvo incubado com 32fmoles do transposon de interesse e 100ng da transposase purificada *Mos1* por 01 hora a 25°C em volume total de 20µL (Tosi e Beverley 2000). A solução continha ainda glicerol [10,0%], hepes [25mM] pH 7,9, BSA acetilada [250µg/20µL], DTT [2mM] e MgCl₂ [5mM]. Na presença de magnésio o transposon é inserido seletivamente em sítios TA.

A reação era interrompida com a adição de 80µL de trisHCl [50mM] pH 7,6; EDTA [10mM]; proteinase K [0,5mg/mL] e tRNA de levedura [250µg/mL] incubando-a por 30 minutos a 30°C. A adição da proteinase K e tRNA permitem o término da reação e facilitam a precipitação do DNA.

Os produtos de transposição foram extraídos por fenol, precipitados e res-suspendidos em 10µL de TE. Dois microlitros da amostra eram transformados em *E. coli*. A seleção foi feita em placas contendo 30µg/mL de kanamicina e 100µg/mL de higromicina B (no caso do GFP-KAN mariner combinado com o pELHYG). Placas controle continham apenas higromicina B (o transposon contém o gene de resistên-cia a kanamicina que permite seleção em bactéria).

A eficiência da transposição foi determinada pelo número de colônias resis-tentes a kanamicina dividido pelo número de colônias resistentes a higromicina B.

6.12. Iniciadores utilizados nas reações em cadeia da polimerase

Iniciadores do transposon GFP-KAN mariner:

GK1 (LT001):CGA.CCA.GGA.TGG.GCA.CCA

GK2 (LT002):GAG.AGT.CAT.AGT.TAC.TAA

Iniciadores do gene HTBF:

Sense (LT007): 5'GCG.CCC.GGG.CAT.ATG.CTC.AAC.GAG.GTG.C

Anti-sense (LT008): 5'CGC.GGA.TCC.TAA.ATA.CCA.ACC.AGA

6.13. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação era montada com 100 a 500 ng de DNA molde, 50 pmoles de cada iniciador, 10µL do tampão TAQ polimerase [10x], 3µL de MgCl₂, 2µL de [10mM] dNTP, 10µL de 50% glicerol, 1µL TAQ polimerase e H₂O em quantidade suficiente para 100µL. A reação era iniciada a 94°C por 5 minutos. Em seguida repetiam-se 30 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos.

6.14. Reação em cadeia da polimerase a partir de colônias (PCR de colônia)

Placas de microtitulação de 96 poços contendo o conjunto de bactérias transformadas com os produtos da transposição do clone pELHYGII-T1 foram diluídas em água (1:10) e utilizadas como molde na reação de PCR.

A reação foi feita em 9,19µL de H₂O Milli-Q, 1,5µL PCR Buffer 10x, 1,5µL dNTP [1,25mM], 0,45µL MgCl₂ [50mM], 0,63µL iniciador 1 [3.2pmoles/µL], 0,63µL iniciador 2 [3.2pmoles/µL], 0,2µL taq polimerase [5 unidades/µL] e 1,0µL de cultura diluída 10x perfazendo 15µL de volume final.

Condições do ciclo, para pré-desnaturação 95°C por 4 minutos, a seguir 30 ciclos de: 95°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos e 30 segundos. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose [1%] conforme descrito no item anterior.

6.15. Reação de seqüenciamento

As seqüências foram geradas utilizando o kit BigDye (Perkin Elmer – Applied Biosystems®) (Sanger, Nicklen et al. 1977). Os produtos de transposição foram utilizados como moldes para seqüenciamento com iniciadores específicos para ambas as extremidades do transposon (vide acima). A reação foi realizada em termociclador Eppendorf® sob as seguintes condições: 96°C por 2 minutos, e 40 ciclos de 96°C por 30 segundos; 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos. As amostras foram processadas em um seqüenciador automático (ABI 377, Perkin Elmer®). As seqüências foram montadas pelo programa DNASTar® da Lasergene®.

6.16. Reação em cadeia da polimerase após transcriptase reversa

Amostras de RNA total extraído para *northern blot* foram utilizadas no kit Ready-To-Go™ RT-PCR Beads da Amersham Pharmacia Biotech®. Foram utilizados 5µg de RNA junto com 50pmoles de cada iniciador em cada tubo da reação. Os tubos foram mantidos a 42°C por 30 minutos e a seguir a 95°C para inativar a transcriptase reversa. Procediam então 45 ciclos de 94°C por 30 segundos , 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos.

6.17. Microscopia confocal

A microscopia confocal foi realizada no microscópio Leica SP5, multi-usuário do departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos desta faculdade, com exceção das imagens da fusão parcial que foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Renato Mortara – UNIFESP.

A microscopia foi realizada *in vivo* após lavar as células várias vezes em PBS e concentradas para $5 \cdot 10^7$ parasitas por mL. Foram então diluídas 1:1 com 2% agarose *low melting point*.

7. RESULTADOS

7.1. Identificação dos genes envolvidos em resistência a terbinafina na região H

A estratégia inicial para identificar o gene de resistência a terbinafina consistiu em delimitá-lo a partir da região H. Para isto o *locus* a ser estudado foi dividido em fragmentos menores que foram testados funcionalmente.

As linhagens de *L. major* H1, H2, H3 e H4 que contêm os epissomas pSNAR-H1, pSNAR-H2, pSNAR-H3 e pSNAR-H4, respectivamente, são provenientes do laboratório do Prof. Stephen M. Beverley - Washington University School of Medicine (Saint Louis - EUA). Esses vetores carregam diferentes porções da região H, conforme esquema apresentado na Figura 4. A linhagem SF-R30 foi obtida pela exposição a concentrações crescentes não letais de terbinafina (Callahan e Beverley 1991).

Estas linhagens foram submetidas a crescimento em cultura em meio M199, na ausência e na presença de terbinafina em diferentes concentrações. Como controle negativo foi usada a linhagem selvagem, LT252, e como controle positivo a linhagem SF-R30. A densidade de células nos inóculos iniciais foi de $1 \cdot 10^5$ parasitas/mL. Este método contempla o fato que o tempo de crescimento das diferentes linhagens e transfectantes é diferente. O momento de contagem das curvas foi padronizado para cada linhagem ou transfectante quando a cultura sem a presença de terbinafina atingisse a fase tardia (que corresponde à densidade celular de 10^7 parasitas/mL)

A curva de crescimento da linhagem LT252, fenótipo selvagem está apresentada na Figura 5a. A linhagem SF-R30, selecionada em terbinafina e que possui a

região H amplificada, demonstra níveis de resistência maiores que a linhagem sensível. Está evidenciada a semelhança da linhagem LT[pSNAR⁸H1] (H1) com a linhagem selvagem (LT252), e também o perfil de resistência da linhagem LT[pSNAR⁸H4] (H4), semelhante ao SF-R30. Determinou-se a concentração da droga que prevê o crescimento de 50% dos parasitas relativo à cultura sem droga, denominado DL₅₀. O fator de resistência da cada linhagem é a relação entre o seu DL₅₀ e o DL₅₀ da linhagem selvagem. Por esta definição o fator de resistência da linhagem selvagem é 1,0. A análise estatística da curva de crescimento foi realizada pela comparação do fator de resistência pelo teste "t" de Student. O DL₅₀ da linhagem selvagem é de 3,8µg/mL de terbinafina, 4,0µg/mL para H1, 7,0µg/mL para H4 e 8,0µg/mL para SF-R30.

Figura 5. (a) Crescimento relativo de diferentes linhagens de *L. major* na presença de terbinafina. LT252: linhagem selvagem. SF-R30: linhagem resistente à terbinafina. H1 e H4: linhagens transfectadas com diferentes fragmentos da região H. O fator de resistência é calculado pela relação da concentração de droga correspondente ao crescimento de 50% de cada linhagem ou transfectante e a concentração de droga correspondente ao crescimento de 50% da linhagem sensível, LT252. (b) Média e desvio padrão do fator de resistência à terbinafina de diferentes linhagens e transfectantes de *L. major*. LT252: linhagem selvagem. SF-R30: linhagem resistente à terbinafina. PQ-R10: linhagem resistente à primaquina. H1, H2, H3 e H4: linhagens transfectadas com diferentes fragmentos da região H. *: $p < 0,05$ quando comparado com a linhagem selvagem. **: $p < 0,05$ quando comparado com todas as outras linhagens.

A Figura 5b apresenta os fatores de resistência das diferentes linhagens e transfectantes. Foram realizadas curvas de crescimento em duplicata contendo, em cada experimento, os controles positivos e negativos LT252 e SF-R30. Os transfectantes H1, LT[pSNAR⁸H2] (H2), LT[pSNAR⁸H3] (H3), todos com fator de resistência próximo de 1,0, não tiveram diferença estatística da linhagem selvagem, LT252. O transfectante H4 e a linhagem PQ-R10 (originada pela exposição à primaquina) apresentaram um fator de resistência o dobro daquele apresentado pela linhagem selvagem e o SF-R30 um fator de resistência três vezes maior. Estas linhagens tiveram um fator de resistência significativamente maior que a linhagem selvagem. Por sua vez, o fator de resistência da SF-R30 também foi significativamente maior que todos os outros transfectantes e linhagens.

7.1.1. Divisão do fragmento H4 e subclonagem dos subfragmentos.

A Figura 6a mostra o mapa de restrição para a enzima *SacI* do fragmento H4 da região H. A digestão produz os subfragmentos T1 (2,8kb), T2 (2,1kb), T3a e T3b (0,8 kb) e T4 (4,9kb). Essa divisão preserva as repetições invertidas T3a e T3b, que correspondem respectivamente à RIME3b e RIME3a presentes no H4 na Figura 4. A RIME 6/2/5d fica contida no subfragmento T1.

Figura 6. (a) Mapa de restrição para a enzima *SacI* do fragmento H4, mostrando os subfragmentos T1, T2, T4 e as repetições invertidas T3a e T3b. (b) Análise do padrão de restrição de clones obtidos com a ligação do pELHYG-II com um combinado dos fragmentos *SacI* do H4. Os números 1-12 correspondem aos clones recuperados na transformação.

Figura 7. Mapa do vetor pELHYG-II. A região azul em destaque representa o fragmento proveniente do pUC19.

7.1.1.1. Construção do vetor pELHYG-II

O vetor pELHYG, número genbank: U84738 foi criado (Garraway, Tosi et al. 1997) com apenas 2128pb de tamanho, contendo uma origem de replicação ColE1 mínima, um aceitor de *splicing* de *Leishmania* mínimo, um promotor T7/*E. coli* e um marcador de resistência a higromicina B. No entanto é limitado por possuir poucos sítios únicos para clonagem. O vetor foi aprimorado recebendo o sítio de policlonagem do pUC19. O sítio múltiplo de clonagem do vetor pUC19 foi digerido com *HindIII* e o pELHYG foi digerido com *BamHI*. Ambos tiveram suas extremidades modificadas com a enzima Klenow (New England Biolabs®), tornando-as aparadas. Após a transformação foi obtido um plasmídeo híbrido em uma única orientação. Este híbrido foi digerido com *PvuII* e religado (Figura 7). O produto final é o vetor pELHYG-II que foi confirmado por digestões diagnósticas. O número genbank é: EU591704. O tamanho do vetor pELHYG-II é de 2458bp.

Listados na Tabela 2 estão os novos sítios únicos de várias enzimas que podem ser utilizados para sub-clonagem no vetor pELHYG-II.

Tabela 2. Sítios únicos de restrição do vetor pELHYG-II

Protusão 3'	Protusão 5'	Aparada
<i>SacI</i>	<i>XmaI</i>	<i>SmaI</i>
<i>KpnI</i>	<i>BamHI</i>	<i>PvuII</i>
<i>SphI</i>	<i>XbaI</i>	
<i>BglI</i>	<i>AvaI</i>	
<i>Apal</i>	<i>SpeI</i>	
<i>SfiI</i>	<i>BstBI</i>	
	<i>BglII</i>	

Portanto, tem-se agora um vetor com vários sítios de restrição únicos e que deixam vários tipos de extremidades. Foram realizadas digestões do pELHYG para confirmar sua estrutura. Todas apresentaram os padrões de restrição esperados.

Foi realizada a digestão do fragmento H4 e do vetor pELHYG-II com a enzima *SacI*. O pELHYG-II foi submetido à ação da fosfatase alcalina. Ambas amostras foram combinadas e submetidas à reação de ligação. O DNA foi então transformado em bactéria. Foram recuperados 12 clones os quais estão apresentados na Figura 6b.

Nos clones 1, 5, 7, 8 e 13 ocorreu apenas a transformação do vetor vazio. No clone 11 temos bandas de 2,8kb e de 2,4kb que correspondem respectivamente ao fragmento T1 e ao pELHYG-II. O fragmento T4 foi recuperado no clone 6, constatado pela banda de 4,5kb. As repetições invertidas foram clonadas nos clones 2, 3 e 10.

7.1.1.2. Análise do subfragmento T4

Realizou-se uma preparação de DNA do clone pELHYG-II::T4, conforme protocolo de transfecção estável em *Leishmania major* (Coburn, Otteman et al. 1991). As células transfectadas eram plaqueadas em meio semi-sólido. Dez a quinze dias após podiam ser observadas colônias isogênicas de *Leishmania*. Foi obtido um transfectante contendo o subfragmento T4. Este transfectante tem fenótipo de resistência à higromicina B, do mesmo gene HYG que também é funcional em *Leishmania* (Ryan, Dasgupta et al. 1993). Isolou-se o DNA epissomal do transfectante obtido para confirmar a transfecção. A Figura 8a apresenta o DNA obtido nesta preparação após sofrer restrição pela enzima *SacI*. Observa-se os fragmentos 4,8kb e 2,4kb do T4 e do vetor, respectivamente, como na Figura 6b.

A linhagem de *L. major* LT[pELHYGII³²T4] (T4-32), inicialmente recuperada na presença de 32µg/mL de higromicina B, quatro vezes o DL₅₀, foi submetida a passagens sucessivas. Está estabelecido que aumento da concentração da marca de resistência é correlacionado ao aumento do número de cópias do epissoma, desta forma, foi obtida uma segunda versão do transfectante. A cada passagem foi colocado o dobro da concentração da droga até a concentração de 500µg/mL, 62,5 vezes o DL₅₀. O transfectante LT[pELHYG⁵⁰⁰T4] (T4-500) (que contém o fragmento T4 subclonado em pELHYG-II mantido a 500µg/mL) foi submetido a ensaio de resistência à terbinafina cujos resultados estão demonstrados na Figura 9. Não houve diferença estatística entre o fator de resistência do T4-500 e a linhagem selvagem.

Figura 8. (a) Análise da digestão do DNA episomal obtido de *Leishmania* transfectante T4 que carrega a construção pELHYG-II::T4. (b) Análise do DNA episomal originário de *Leishmania* transfectada com o episoma pELHYG::T1 por digestão com a enzima de restrição *Nco*I.

Figura 9. Média e desvio padrão do fator de resistência à terbinafina em diferentes linhagens e transfectantes de *L. major*. LT252: linhagem selvagem. T4-500: transfectante T4 mantido a 500µg/mL de higromicina B. T1-32 e T1-500: transfectante T1 e mantido a 32 e 500 µg/mL de higromicina B respectivamente. H4: transfectante pSNAR-H4. L82-500: transfectante L82-500 (T1-500 após transposição com o GFP-KAN mariner). Curado: T1-500 curado do epissoma pELHYG:T1. *: $p < 0,05$ quando comparado a linhagem selvagem.

7.1.1.3. Análise do subfragmento T1

O fragmento T1 (alterado pela T4 DNA polimerase para deixar as extremidades aparadas) foi clonado no pELHYG no sítio de *Bg*/II (submetido à ação da enzima Klenow para deixar as extremidades aparadas). Não foi obtida a transfecção da construção pELHYG-II::T1. Já o clone com a construção pELHYG::T1 foi transfectado em *Leishmania* e passado para meio líquido contendo 32µg/mL de higromicina B.

O transfectante de *L. major* LT[pELHYG³²T1] (T1-32) foi submetido à pressão por terbinafina. Os fatores de resistência derivados das curvas de crescimento obtidas estão demonstrados na Figura 9. Pode ser observado que as curvas de crescimento do transfectante T1-32 e da linhagem selvagem não apresentam diferenças.

Para se confirmar a presença do epissoma pELHYG-T1 no transfectante T1, foi feita a extração de DNA epissomal por meio de miniprep. Este DNA foi transformado em bactéria e após recuperação do DNA epissomal foi digerido com a enzima *Nco*I, apresentando o padrão de restrição esperado de 2 fragmentos de 1500pb e 3400pb (Figura 8b).

Para aumentar o número de cópias do epissoma, pelo mesmo protocolo utilizado para o transfectante T4-500, aumentou-se a concentração de higromicina B no meio de cultura do transfectante T1-32 em passagens sucessivas, originando o T1-500. Novamente foi feita uma curva de crescimento comparando-se LT[pELHYG⁵⁰⁰T1] (T1-500) aos controles positivo (H4) e negativo (LT252). Na Figura 9 observa-se que o esperado aumento no número de cópias do plasmídeo pELHYG::T1 no transfectante T1-500, estimulado pela maior concentração de higromicina B no meio, é associado a um fator de resistência comparável aos níveis de resistência observados em linhagens de controle positivo (transfectante H4). Não

houve diferença estatística significativa entre o T1-500 e a linhagem H4, ao passo que ambos apresentam fator de resistência significativamente diferente do fator de resistência selvagem com $p < 0,05$ pelo teste "t" de Student.

Através da passagem em meio não seletivo, selecionou-se uma linhagem do transfectante T1-500 que perdeu seu episssoma, linhagem curada. Obteve-se a recuperação do fenótipo de sensibilidade, com fator de resistência sem diferença significativa da linhagem selvagem, visto na Figura 9.

7.2. Identificação do gene de resistência à terbinafina

Utilizou-se o fragmento T1 no vetor pELHYG-II como alvo de experimentos de transposição *in vitro* utilizando o transposon GFP-KAN mariner. A transposição na presença de magnésio ocorre seletivamente em sítios TA. O transposon GFP-KAN mariner (Figura 10) possui um gene repórter GFP que não possui códon ATG iniciador. Assim, caso seja inserido em fase com um gene do DNA alvo, uma proteína de fusão será criada. Foram pescados 96 clones de uma reação de transposição do GFP-KAN mariner no fragmento T1 dos quais 45 foram seqüenciados. A Figura 11 mostra um mapa de inserções do fragmento T1. A Figura 12 mostra uma representação desta região.

Figura 10. O transposon GFP-mariner. GFP: proteína fluorescente verde; KAN: gene que confere resistência à kanamicina. IR: repetições invertidas.

Figura 11. Seqüenciamento do fragmento T1. Na porção superior está representado o MAPA de inserções ao longo do fragmento T1. Flechas apontam para a orientação em que se inseriram no inserto. Na porção inferior estão representados cada seqüências obtida, a sua posição e sentido em relação ao T1 e o contig gerado pelo seu alinhamento.

Figura 12. Representação das fases abertas de leitura do fragmento T1 (2800pb) através de flechas. Quadrados representam trilhos de pirimidinas. AG: Dinucleotídeos AG, sítios de aceção do spliceossoma.

O fragmento T1 foi completamente seqüenciado, revelando a extremidade 3' de uma ORF (fase aberta de leitura) e duas outras ORF inteiras. A seqüência do fragmento T1 foi submetida ao banco de dados Entrez - NCBI/NLM/NIH com o número de acesso: AY227807. Cada uma das ORF foi registrada neste mesmo banco de dados com os números: AAO73006 e AAO73007. A ORF2 tem 570 pares de base enquanto que a ORF3 tem 360. Foram encontrados também dinucleotídeos AG na região flanqueadora 5' dos genes e trilhos de bases pirimidínicas na região flanqueadora 3'. Este seqüenciamento difere daquele apresentado pelo projeto genoma da *L. major* disponível na internet onde não está identificada a terceira ORF (Myler, Beverley et al. 2001). São reproduzidas a seguir ambas as versões que explicam a razão da ORF3 não ter sido anotada. Utiliza-se um limite arbitrário de no mínimo 100 códons para ser anotado como uma fase aberta de leitura. Na versão com uma timidina a menos, ocorre uma leitura errada dos códons que se seguem, gerando um códon de parada após 35 códons da metionina inicial.

Seqüência obtida em nosso laboratório referente a ORF3

ATG.TGC.GTC.TGT.GTG.TGT.GTG.CTC.TCT.CCT.ATC.GCT.CTG.CCG.TCC.TTT.G**TT.**
TTT.TTT.TTG.TTT.GTG.TGT.GCT.CGT.ATC.TCT.CTC.TCT.GTG.CAA.TCC.CTG.ATG.
 ACG.TGG.GAC.ACC.TCA.GTG.CGT.CGC.TTC.GCA.GGG.TGC.CGT.GAT.GCC.CCC.GCC.
 ATC.GGC.ACC.CAT.ACT.GGT.CTA.CCT.ATG.GTG.GTC.AGA.GGC.TCG.AGC.GCC.TAC.
 GAC.GTG.GGG.AGG.TCA.GTG.GGA.TTC.ATC.GCT.GCT.GAT.GTC.GGT.GGT.GCT.TCG.
 GTG.CGA.CCT.GCG.ACA.GCG.AGC.ACA.CGC.TTG.TGC.CAT.CCA.TGT.GAT.GGG.CGA.
 AGT.GTC.CGC.TTG.ACT.CAA.GCG.TAT.CCT.ACC.CCC.GGC.CCT.CAC.ACT.GCG.TGC.
TGA

Seqüência do projeto genoma da ORF3

ATG.TGC.GTC.TGT.GTG.TGT.GTG.CTC.TCT.CCT.ATC.GCT.CTG.CCG.TCC.TTT.G**TT.**
TTT.TTT.TGT.TTG.TGT.GTG.CTC.GTA.TCT.CTC.TCT.CTG.TGC.AAT.CCC.**TGA**.TGAC
 GTGGGACACCTCAGTGCGTCGCTTCGCAGGGTGCCGTGATGCCCCGCCATCGGCACCCATACTGGTC
 TACCTATGGTGGTCAGAGGCTCGAGCGCCTACGACGTGGGGAGGTCAGTGGGATTCATCGCTGCTGAT
 GTCGGTGGTGCTTCGGTGCGACCTGCGACAGCGACACACGCTTGTGCCATCCATGTGATGGGCGAAG
 TGTCCGCTTGACTCAAGCGTATCCTACCCCCGGCCCTCACACTGCGTGCTGA

A seguir, na Figura 13, pode-se verificar quatro trechos de nosso seqüenciamento, sendo três no sentido inverso e um no sentido de leitura da ORF3, confirmando, com alta qualidade, a presença de 10 nucleotídeos de timidina, e não nove.

A análise das repetições invertidas conservadas da região H encontrou uma das repetições invertidas, a Ribosomal Mobile Element (RIME) 6/2/5d sobreposta a ORF3 em 74%, sendo que 93 nucleotídeos da extremidade 5' da ORF3 não fazem parte da RIME, como pode ser visto na Figura 14 (Dias, Ruiz et al. 2007). A ORF3 não está presente junto às outras repetições.

Figura 13. Quatro eventos de transposição independentes seqüenciados demonstrando a presença de dez resíduos de timidina na ORF3 do fragmento T1. Os números se referem ao ponto de partida de cada seqüência.

Figura 14. Relação entre a ORF3 e a RIME 6/2/5d.

7.2.1. Análise *in silico* das fases abertas de leitura do fragmento T1

As ORF foram submetidas à comparação no banco de dados BLAST (Altschul, Gish et al. 1990) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O resultado desta comparação com genes de diferentes organismos representativos está apresentado na Figura 15. As maiores homologias em gêneros diferentes são: *Trypanosoma cruzi*, com 61% de identidade; *Trypanosoma brucei*, com 56% de identidade; *Tetrahymena thermophila*, com 45% de identidade e *Paramecium tetraurelia*, com 41% de identidade. Foi encontrados até o centésimo homólogo, identidade de 26% e valor E de $4 \cdot 10^{-10}$. A análise de homólogos revelou que esta seqüência apresenta homologia de 27% com a proteína Yip1p (Yang, Matern et al. 1998) de *S. cerevisiae* que é o protótipo para os domínios consenso COG5080 e pfam04893 (Marchler-Bauer, Anderson et al. 2005). Nestes bancos de dados o domínio YIP é descrito como domínio de membrana composto por quatro alfa-hélices transmembranais. O domínio é caracterizado ainda pelos motivos DLYGP e GY. A proteína Yip1p está presente principalmente no complexo de Golgi, estando envolvida em transporte vesicular que interage com Rab GTPases.

A seqüência predita de aminoácidos desta ORF foi submetida a análise de domínios transmembranais pelo sistema sosui (Hirokawa, Boon-Chieng et al. 1998). Prediz-se uma proteína de membrana possuindo 4 alfa-hélices de 22 a 23 resíduos (Figura 16).

A ORF3 também foi submetida a análise de homologia de nucleotídeos pelo BLAST que revela semelhança com seqüência originária do cromossomo 23 de *Leishmania chagasi*. Salienta-se que a homologia ocorre com a porção 3' da seqüência, que corresponde à seqüência da RIME6/2/5d. Uma segunda análise da ORF3

pela tradução da seqüência de nucleotídeos encontra homologias fracas com *score* inferior a 40 e valor E próximo a 1,0.

Figura 15. Seqüência prevista de amino ácidos do gene ORF2 do fragmento T1 alinhamento com proteínas homólogas de outros organismos representativos. Foi destacado em quadrado cinza os sítios definidores do domínio Yip. DLYGP (posição 53 da proteína de *L. major*) e GY (posição 117 da proteína de *L. major*).

Figura 16. Representação da sequência de aminoácidos da ORF2 com as predições de alfa-hélices. Hélices transmembranais: Resíduos 52-73, tamanho (número de resíduos) 22: DWDLWGPLFLCLILASILTINA; Resíduos 84-106, tamanho 23: AVFIFVWLGGVLVTVNAKLLGSK; Resíduos 126-148, tamanho 23: GALLCCVLPWFLLNLMLCFMAWA; Resíduos 163-185, tamanho 23: SADREVLVVYPVGLFYVFFTW MV.

7.2.2. Definição do gene que confere resistência à terbinafina através da mutagênese insercional

Tendo identificado fases abertas de leitura no fragmento T1, foi utilizada a mutagênese insercional inativando seletivamente cada uma para se identificar qual estaria associada a resistência à terbinafina. Foram sintetizados iniciadores para a ORF2 encontrada no T1. A capacidade do transposon mariner de se inserir em um sítio TA aleatoriamente pode ser utilizada também para se inativar um gene. A inserção pode comprometer a funcionalidade do gene, tornando-o truncado. A ORF2 foi alvo desta estratégia, chamada de mutagênese insercional. Dentre os 96 eventos de transposição utilizados no seqüenciamento, foram identificados 5 com inserção na ORF2. Isto foi evidenciado por um PCR de colônia utilizando-se os iniciadores para a segunda ORF (Figura 17). A inserção do transposon no clone 82 ocorre no terço proximal do gene, no dinucleotídeo TA posicionado 141 pares de base da extremidade 5'.

O LT[pELHYG³²T1::GFP*K82] (L82-32) foi o resultado obtido pela transfecção do produto da transposição do clone 82. Após passagens sucessivas em concentrações maiores de higromicina B, obteve-se o transfectante LT[pELHYG⁵⁰⁰T1::GFP*K82] (L82-500), que foi então submetido a análise de resistência à terbinafina (Figura 9). Observa-se que o mesmo apresentou fator de resistência significativamente diferente do transfectante T1 e não apresentou diferença em relação a linhagem selvagem.

A mutagênese insercional foi realizada na ORF3 por transposição. O transfectante LT[pELHYG³²T1::GFP*F08] (F08-32) foi obtido pela transfecção da fusão F08. Nesta construção o transposon se inseriu no dinucleotídeo TA posicionado a

172 pares de base da extremidade 5' da ORF3 entrando em fase com a proteína. Foi submetido ao mesmo processo de incremento da higromicina B para originar o transfectante LT[pELHYG⁵⁰⁰T1::GFP*KF08] (F08-500). A análise da hidrofobicidade da ORF3 e da construção F08 (Figura 18) prediz que a proteína codificada pela ORF3 é membranar com uma alfa-hélice de 23 resíduos. A fusão F08 com a ORF3 foi confirmada funcionalmente pela detecção de emissão de fluorescência no transfectante F08-500 observados em microscopia de fluorescência confocal (Figura 19). A fluorescência foi detectada de maneira difusa no citoplasma.

O fator de resistência do transfectante F08-500 foi significativamente maior que o da linhagem selvagem (Figura 20). Não há outras fases abertas de leitura inteiras no fragmento T1. A ORF2 foi denominada HTBF, do inglês: *H-region associated TerBinaFine resistance gene*. Um resumo de toda a estratégia de delimitação do gene HTBF está apresentado na Figura 21 e foi publicado (Marchini, Cruz et al. 2003).

Figura 17. PCR de colônia de uma placa de transposição com o GFP-mariner do T1 utilizando os iniciadores LT007 e LT008. São mostrados dois eventos em que ocorre a inserção do transposon no T1.

Orf3

ORF3+Fusão com GFP

Figura 18. Hidrofobicidade das proteínas preditas pela ORF3 e pela após sua fusão com a GFP na construção F08. O quadrado verde representa o local de predição de uma alfa-hélice transmembranaral, composto pelos resíduos SPIALPSFVFFLFVCARISLSVQ.

Figura 19. Imagens representativas de visualização *in vivo* em microscopia de fluorescência confocal, fluorescência à direita e DIC a esquerda. As duas superiores são do transfectante F08-500 e as duas inferiores do controle, a linhagem LT252. A escala representada é de 5µM.

Figura 20. Fator de resistência de *L. major* da linhagem selvagem LT252 e transfectante F08-500: linhagem transfectada com fragmento T1 do H4 após mutagênese insercional da ORF3. * Significativamente diferente pelo teste "t" de student ($P < 0,05$).

Figura 21. Resumo da estratégia de delimitação do HTBF. (A) Quatro fragmento diferentes do locus H (H1, H2, H3 e H4) foram subclonados no vetor pSNAR e usados em ensaios de resistência à terbinafina. Sinais de negativo e positivo representam sensibilidade ou resistência a droga. (B) Fragmentos *Sacl* do H4 (T1, T2, T3a, T3b e T4) foram subclonado no vetor pELHYG e testados para resistência à terbinafina; S = Sítio *Sacl*. (C) Seqüenciamento de T1 revelou 03 fases abertas de leitura indicadas pelas setas brancas. As flechas representam eventos de transposição tanto no HTBF quanto na ORF3 do transposon GFP-mariner. A inserção 82 que originou o transfectante L82-500 e a inserção F08 que originou o transfectante F08-500 estão relacionados.

7.3. HTBF no transcriptoma de *L. major* e no genoma de *Leishmania*

A expressão do HTBF foi estudada nas diferentes linhagens e transfectantes utilizadas neste estudo, para avaliar diferenças entre sensíveis e resistentes e entre pressão por higromicina B de 32 e 500 µg/mL. Foi realizada a extração do RNA total da linhagem selvagem e SF-R30, além dos transfectantes T4-500, T1-32 e T1-500. Foram utilizados como sonda o gene da actina, o fragmento *Avall* do pELHYG e o produto de amplificação do HTBF. O fragmento do vetor pELHYG escolhido corresponde a maior parte do gene de resistência à higromicina B. A expressão do gene de resistência à higromicina B foi proporcional à pressão por droga em todos os transfectantes. Já o HTBF foi detectado na linhagem SF-R30 e em ambas as que contêm o fragmento T1 apesar de estar menos expresso no T1-32 (Figura 22).

A presença do gene HTBF foi pesquisada no genoma de outras espécies de *Leishmania* para determinar se o mesmo poderia estar presente apenas em *L. major*. O gene HTBF foi caracterizado no genoma da *L. major* e de outras espécies de *Leishmania*. Procurou-se identificar o HTBF por hibridação em cromossomos de outras espécies de *Leishmania* (Figura 23). É conhecido que a região H está contida no cromossomo 23. Quando se realizou pesquisa no banco de dados de nucleotídeos, blastn (do www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) da sequência do T1 temos 99% de identidade com cosmídeo L1063 que faz parte do cromossomo 23 de *Leishmania major* Friedlin.

Figura 22. Análise da expressão de RNA total em diferentes linhagens e transfectantes (sondas utilizadas são: produto de reação em cadeia da polimerase do HTBF, fragmento *Avall* do pELHYG e sonda de actina).

Figura 23. Análise do gene HTBF em diferentes espécies de *Leishmania*. As canaletas contém DNA genômico separado em eletroforese de campo pulsado e transferido para a membrana através da técnica de Southern blot 1: LEM1317 2: LEM1163 3: LEM1958 4: *L. major* "Friedlin" 5: *L. chagasi* 6: *L. mexicana* 7: *L. amazonensis* 8: LT252 9: *L. braziliensis* 10: Lambda ladder PFG marker New England Biolabs®. O cromossomo 23 tem 760kb.

Figura 24. Análise do gene HTBF em diferentes espécies de *Leishmania*. As canaletas contém DNA genômico digerido pela enzima *SacI* separado em eletroforese e transferido para membrana de nylon através da técnica de Southern blot. 1: *L. major* "Friedlin" 2: LT252 (*L. major*) 3: *L. chagasi* 4: *L. mexicana* 5: *L. amazonensis* 6: *L. braziliensis*.

Figura 25. Análise da transcrição do HTBF. RNA total de linhagens LT252 (coluna 1); SF-R30 (coluna 6) e transfectantes T4-500 (coluna 2); T1-32 (coluna 3); T1-500 (coluna 4) e L82-500 (coluna 5). A porção inferior da figura é uma foto do gel de eletroforese exposta a luz UV e a porção superior corresponde ao sinal da hibridização com uma sonda HTBF. A ponta de seta indica o transcrito de 3,9kb.

Na Figura 24 a membrana foi obtida pela transferência por Southern *blotting* de um gel de agarose, cujas amostras foram *plugs* digeridos com a enzima *SacI*. Observa-se que nas primeiras duas colunas o sinal de 2,8kb, correspondente ao próprio subfragmento T1. Estas duas colunas contêm a mesma espécie, *L. major*, apesar de serem linhagens diferentes. A *L. chagasi* apresenta um sinal semelhante. Os sítios *SacI* em *L. mexicana* e *L. amazonensis* não são conservados, apesar de manterem homologia suficiente para hibridação com a sonda HTBF, fato que não ocorreu com *L. braziliensis*. Em todas as espécies foi encontrado sinal em apenas uma banda.

Realizou-se uma análise do RNA total das linhagens e transfectantes estudadas. O RNA foi fracionado em gel de agarose, transferido para membrana de náilon e hibridizado com uma sonda do HTBF (Figura 25). Nota-se que a expressão nas linhagens sensíveis não foi detectada. Observa-se uma banda de 1,9kb nas colunas 3, 4, 5 e 6. Nota-se um aumento da quantidade de RNA da coluna 3 para coluna 4 que pode ser correlacionado ao aumento da pressão por droga. Observa-se, além disso, a presença de uma banda de 5kb nessas mesmas colunas além de uma banda de 10kb não mostrada na figura, que não está presente na coluna 6. Na coluna 5 é encontrada uma banda 2kb maior que a das outras colunas, de 3,9kb.

Para caracterização qualitativa da transcrição do gene HTBF, o RNA total das linhagens e transfectantes LT252 (selvagem), T4-500, T1-32, T1-500, L82-500, SF-R30, T1-R4 (transfectante T1 com 4µg/mL de terbinafina, em ausência de higromicina B), T1-R9 (transfectante T1 com 9µg/mL de terbinafina, em ausência de higromicina B), L82-R4 (transfectante L82 com 4µg/mL de terbinafina, em ausência de higromicina B).

Sendo que é esperado uma expressão basal do HTBF mesmo nas linhagens selvagens e que a sensibilidade do método de *northern blot* pode não ser suficiente para detectá-lo, foi realizada PCR com transcriptase reversa para definir se existe ou não esta expressão basal. Em experimentos de RT-PCR estas amostras foram utilizadas em reação de transcriptase reversa seguida de amplificação por PCR utilizando os iniciadores LT007 e LT008. Como controle, as mesmas amostras foram utilizadas em reações de amplificação por PCR sem o passo prévio de transcrição reversa. A Figura 26 mostra um gel de agarose contendo o produto de amplificação destas reações. O controle das amostras está no painel B. A ausência de bandas no painel B demonstra que não houve contaminação por DNA nas amostras. Observa-se na Figura 26a, a amplificação de um fragmento de cerca de 500pb em todos os transfectantes e linhagens. Este transcrito está presente, portanto, no RNA total de todos os transfectantes e linhagens. Verifica-se também que na canaleta 4 da Figura 26a, (correspondente ao RNA provindo do transfectante L82-500), obteve-se uma banda 2kb maior, de 2500pb.

Figura 26. Gel de agarose contendo produtos de amplificação da reação de RT-PCR. 1: LT252 2: T4-500 3: T1-500 4: L82-500 5: SF-R30 6: T1-R4 7: L82-R4. (a) Reação com transcriptase reversa. (b) Mesma reação na ausência da transcriptase reversa.

7.4. Ensaios para testar hipóteses de mecanismos de resistência

7.4.1. Resistência através da ativação da maquinaria de reparo de membranas

Foram realizados experimentos para estudar a resistência proporcionada pelo HTBF dependendo do cálcio extracelular. Para se excluir a própria influência do cálcio no crescimento do parasita, foi executada uma curva de crescimento com concentrações crescentes do quelante de cálcio, EGTA. Observa-se na Figura 27 que até 1mM de concentração de EGTA o crescimento da linhagem selvagem manteve-se inalterado.

Utilizou-se, portanto, a concentração de 1mM de EGTA para realizar curvas de crescimento com o transfectante resistente T1-500 a fim de observar o comportamento da resistência com a quelação do cálcio e quando comparado com a linhagem selvagem.

A Figura 28 apresenta os fatores de resistência derivados destas curvas de crescimento. A linhagem LT252 não apresenta diferença significativa no crescimento em terbinafina na presença ou ausência do EGTA. Já no transfectante T1-500 a ausência do EGTA tornou o transfectante sensível perdendo a diferença estatística com a linhagem selvagem.

Figura 27. Crescimento da linhagem LT252 de *L. major* em concentrações crescente de EGTA. Abscissa em escala decimal até a quebra e escala logarítmica após a quebra.

Figura 28. Média e desvio padrão do fator de resistência à terbinafina da linhagem LT252 e transfectante T1-500 na ausência e presença de 1mM de EGTA. *: significativamente diferente pelo teste T de student em comparação à linhagem selvagem ($p < 0,05$).

7.4.2. Resistência através da otimização da depleção

A co-transfecção do plasmídeo pxMRPA no transfectante T1-500, foi feita para observar uma possível sinergia na ação dos produtos dos genes MRPA e HTBF no fenótipo de resistência aos metais pesados. A co-transfecção do LT[*pELHYG*⁵⁰⁰*T1.pXG*⁸*MRPA*] (Cotransf 500/8) foi confirmada por meio da hibridação em membrana de náilon (Figura 29). Este co-transfectante foi mantido em concentrações crescentes de G418, iniciando em 8µg/mL chegando até 96µg/mL, constituindo então o LT[*pELHYG*⁵⁰⁰*T1.pXG*⁹⁶*MRPA*] (Cotransf 500/96). O transfectante LT[*pXG*⁸*MRPA*] (H3-8) foi utilizado como controle positivo de resistência ao antimonial.

Os resultados do ensaio do crescimento das diferentes linhagens e transfectantes na presença de antimonial trivalente estão apresentado na Figura 30. Observou-se que os co-transfectantes são cinco vezes mais sensíveis ao antimonial trivalente em relação ao transfectante H3-8, mas não são sensíveis como a linhagem selvagem, apresentando diferença significativamente estatística. O transfectante T1-500 apresenta um nível de resistência discreta com fator de resistência de 2,0 com significância estatística, assemelhando-se ao nível de resistência do T1-500 em relação à HTBF.

Figura 29. Confirmação do sucesso da co-transfecção do vetor pxMRPA no transfectante T1-500. Eletroforese de DNA extraído de bactéria transformada com DNA provindo do Cotransf 500/8 crescido em ampicilina. DNA foi digerido com *EcoRI*. O gel (coluna da esquerda) foi transferido para membrana de nylon por Southern blot e hibridizado com uma sonda MRPA (coluna da direita).

Figura 30. Média e desvio padrão do fator de resistência ao antimonial trivalente das diferentes linhagens e transfectantes. Cotransf 500/8 se refere ao transfectante T1-500 cotransfectado com pxMRPA sendo mantido a 500µg/mL de higromicina B e 8µg/mL de G418. Cotransf 500/96 se refere ao mesmo transfectante após passagens sucessivas em concentrações crescentes de G418 até 96µg/mL. H3(8) se refere ao transfectante pxMRPA em 8 µg/mL.

7.5. Localização sub-celular do HTBF

A localização sub-celular de proteínas ajuda na definição da função destas, já que suas ações terão relação com local onde está presente na célula. Considerando isto, foram clonados fusões com o HTBF. Foram analisados transfectantes do parasita que contêm a fusão do gene HTBF com a GFP. Nenhuma das transposições obtidas previamente ocorreu em fase com o gene HTBF. Tendo com alvo o clone pELHYG-T1, foram geradas inserções utilizando o elemento GFP-KAN mariner. As inserções foram mapeadas pelo seqüenciamento de 194 eventos. A análise das seqüências revelou um evento de inserção do transposon em fase de leitura com o gene HTBF localizado após 130 pares de base do ATG inicial, a transposição D01-6. Observa-se no painel inferior da Figura 31 o padrão de hidrofobicidade da proteína expressa pelo gene HTBF e desta fusão que foi identificada. A análise do padrão de hidrofobicidade da proteína revela a perda de todos os domínios transmembranaais. Esse DNA foi transfectado originando o LT[pELHYG⁵⁰⁰T1::GFP*KB05] (B05-500).

Para se obter uma fusão HTBF-GFP onde a proteína HTBF pudesse ter uma maior probabilidade de manter a função e sua localização, foi construída uma fusão mantendo a maior porção possível do gene original. Isto foi realizado com enzimas de restrição e subclonagem. O pXG-GFP foi digerido com *NheI* e *SaII* e, após ter as extremidades aparadas foi religado, desta forma eliminando-se um sítio *BsrGI*. O vetor foi digerido com a própria *BsrGI*, que passara a ser sítio único, aparado novamente e ligado com um fragmento de 668pb da digestão *BsaAI* do pELHYG-T1. Nesta construção foram perdidos apenas os primeiros seis aminoácidos do HTBF, que foi então transfectado, originando a linhagem LT[pELHYG⁵⁰⁰T1::GFP7] (T1-500-clone 7). O padrão de hidrofocidade está apresentado no painel superior da

Figura 31. As células foram então analisadas em microscopia de fluorescência confocal *in vivo* (Figura 32).

As imagens do confocal sugerem que o produto de fusão do GFP-KAN mariner com o HTBF está disperso de forma inespecífica no citosol, no entanto, sem delimitar o núcleo. Já o sinal de fluorescência da fusão construída ficou restrito a um compartimento localizado. No âmbito de outro projeto em andamento no mesmo laboratório, marcadores para bolsa flagelar e endossomo não co-localizaram com a fusão. Por outro lado um marcador específico para Golgi apresentou co-localização.

HTBF e GFP-HTBF

HTBF e HTBF-GFPKAN mariner

Figura 31. Comparação das fusões com o HTBF. Padrões preditos de hidrofobicidade (Kyte-Doolittle) das proteínas expressas pelo gene HTBF e de sua fusão com GFP. Os quadrados representam predições de alfa-hélices, obtidas pelo sistema SOSUI (Hirokawa, Boon-Chieng et al. 1998). A linha pontilhada no esquema superior representa o resíduo a partir do qual ambas as construções são idênticas. A linha pontilhada no esquema inferior representa o resíduo até o qual ambas as construções são idênticas. Observa-se a perda da maior parte do HTBF na fusão obtida com a transposição e a manutenção quase completa do HTBF na fusão construída.

Figura 32. Imagens representativas de visualização *in vivo* em microscopia de fluorescência confocal, DIC+fluorescência. As duas superiores são do transfectante B05-500 e as duas inferiores do transfectante T1-500-clone 7.

8. DISCUSSÃO

Tendo encontrado resistência à terbinafina em *L. major* e sua correlação com amplificação da região H estabeleceu-se o objetivo de identificar o gene responsável por esta resistência. Inicialmente a estratégia utilizada consistiu em fragmentar a região H e testar cada uma destas porções para a resistência. Portanto conseguiu-se delimitar funcionalmente a resistência da região H de 45kb para uma região de 10kb da extremidade 3', o fragmento H4 e em uma reiteração deste experimento, uma segunda delimitação para uma porção de 2,8kb denominada T1.

Nesta reiteração o fragmento H4 foi subdividido de forma a separar as repetições invertidas, RIME3, onde não se espera encontrar genes. Os fragmentos foram subclonados no vetor pELHYG. Para aprimoramento deste vetor, foi incluído um *polylinker*, sítio múltiplo de clonagem, facilitando subclonagens. Isto acrescenta aproximadamente 300pb no vetor, o que corresponde a 14% do seu tamanho. A vantagem deste sítio são vários sítios de restrição únicos de endonuclease permitindo extremidades aparadas ou com fragmentos seja 5' ou 3'. Esses sítios ocorrem fora de genes essenciais do plasmídeo, permitindo o seu uso para subclonagem (Tabela 2). A facilidade do trabalho com estes vetores vem do fato que são funcionais tanto em bactéria quanto em *Leishmania*. Em virtude de seu pequeno tamanho, mesmo com o acréscimo do sítio múltiplo de clonagem, são ideais para a transposição minimizando eventos de transposição fora do inserto. Além disso, eventuais transposições em regiões fora do vetor podem ainda cair em elementos essenciais do vetor, inviabilizando sua manutenção. Ao mesmo tempo, permite o trabalho com insertos maiores. O vetor pELHYG contém o gene de resistência HYG que expressa uma fosfotransferase com afinidade pela higromicina B. Seu modo de ação consiste na

fosforilação desta proteína e na sua conseqüente inativação (Smith e Baker 2002). A higromicina B ao ser fosforilada perde sua afinidade pela subunidade 30S ribossomal e seu efeito microbicida, permitindo a resistência. Este gene é funcional tanto em *E. coli* quanto em *L. major*.

A resistência só foi demonstrada no subfragmento T1 quando o transfectante ficou sob pressão de 500µg/mL de higromicina B. Foi estabelecido que o aumento da pressão estimula o aumento da expressão do gene HYG possivelmente pelo aumento do número de cópias do epissomo e isso é confirmado neste trabalho, ou seja, o aparecimento da resistência à terbinafina foi devido à presença do epissomo pELHYG::T1 e não o estímulo de 500µg/mL de higromicina B *per se*. Enumera-se os seguintes argumentos constatados nos resultados: primeiro, o transfectante T4-500 foi exposto às mesmas condições e não apresentou o fenótipo de resistência à terbinafina. Segundo, soma-se a isso a evidência de que o parasita curado de higromicina B perdeu a resistência, confirmando não ter havido outra alteração genômica. Finalmente, a transfecção de uma terceira linhagem, a linhagem L82-500, não se tornou resistente, apesar de ter tido o mesmo estímulo de 500µg/mL de higromicina B.

Salienta-se que o fator de resistência apresentado pela linhagem SF-R30 é significativamente maior que o fator de resistência do transfectante H4 e a linhagem PQ-R10. A região H não é a única fonte de resistência à terbinafina no genoma da *L. major*. De fato, genes de resistência à terbinafina possivelmente fora da região H já foram demonstrados (Cotrim, Garrity et al. 1999).

Para identificar o gene, realizou-se o seqüenciamento do subfragmento que foi delimitado, de apenas 2,8kb. O sistema mariner foi utilizado, pois forneceria ainda eventos de transposição com mutagênese insercional e fusões com genes de in-

teresse. O transposon inserido no inserto DNA serve como uma ilha de seqüência conhecida dentro de um mar de seqüências desconhecidas. Os iniciadores utilizados na reação de seqüenciamento são ambas as pontas do transposon (foram denominados GK1 e GK2). Desta forma, a partir das inserções será possível seqüenciar o fragmento.

O transposon mariner se insere aleatoriamente em qualquer local do DNA alvo. Na presença de íons magnésio se insere aleatoriamente em dinucleotídeos TA. Uma coleção de transposons foi desenvolvida com este sistema, destinado a realizar uma fusão com o gene de interesse, por exemplo, do gene GFP. Outra construção interessante inclui a fusão com um gene de resistência a droga (neomicina) viabilizando a seleção de eventos de fusão. As construções permitem fusões pois é retirado o códon ATG iniciador do gene repórter. Isto garante que sua expressão ocorra apenas quando o transposon se insere em um gene, mas ao mesmo tempo isso só ocorre em dinucleotídeos TA em fase com o mesmo.

O transposon escolhido foi o GFP-KAN mariner que comporta uma GFP modificada para ser estimulada com espectro visível (Chalfie, Tu et al. 1994). Isto representa uma grande vantagem, pois os sistemas de microscopia confocal com estimulação do espectro visível são mais econômicos do que sistemas que comportam a estimulação ultra-violeta. A modificação presente consiste na mutação S65T (Cubitt, Heim et al. 1995). A GFP do tipo selvagem tem dois picos de excitação, um principal a 395nm e outro menor a 475nm com coeficiente de extinção de 30.000 e 7.000 M⁻¹cm⁻¹. Seu pico de emissão é de 509nm. A absorbância e a fluorescência devem-se ao cromóforo *p*-hidroxibenzilideneimidazolinona formado pela ciclização dos resíduos 65-67 (serina, tirosina e glicina) e uma 1,2-desidrogenação da tirosina. A maioria das mutações da GFP nestes resíduos resulta na perda parcial ou com-

pleta da fluorescência. A extremidade N-terminal é fundamental já que a perda de mais do que um resíduo leva a perda da fluorescência, assim como mais do que dez resíduos da extremidade C-terminal. O mutante S65T leva à perda da absorbância a 395nm e um desvio para a direita do pico remanescente para 488nm, ultrapassando o espectro UV para dentro do espectro visível.

O seqüenciamento resultante revela a presença de três fases abertas de leitura, sendo duas completamente presentes no subfragmento T1. Comparando-se a ORF3 com a seqüência apresenada pela leishdb constata-se a ausência de um resíduo de timidina, sendo encontradas nove timidinas, ao invés de dez. Isto acarreta a uma interpretação errônea da fase aberta de leitura, de maneira análoga a uma mutação perda de sentido (*nonsense*). Esta interpretação leva a uma imprecisão de anotação no banco de dados de leishmania. Múltiplos nucleotídeos idênticos em seqüência podem representar um obstáculo à fidelidade da seqüência, especialmente se presentes no final do cromatograma. No entanto, isto não ocorreu neste laboratório. A boa qualidade do seqüenciamento obtido pode ser constatada pelos cromatogramas dos quais se derivou a seqüência. Foram obtidas três seqüências no sentido contrário ao gene e uma no sentido a favor, todas com cromatograma fidedigno. Uma outra hipótese é o subfragmento T1 que foi seqüenciado, obtido finalmente da amplificação gênica da região H da linhagem SF-R30, seja diferente, da linhagem *L. major* "Friedlin" seqüenciada pela projeto genoma de *L. major*.

A imprecisão encontrada no banco de dados leva a um questionamento dos seqüenciamentos de milhões de pares de bases realizados nos projetos genomas de diferentes espécies no qual pequenas imprecisões como esta podem levar a ausência de identificação de genes (caso em questão), caracterização de um gene como um pseudogene, por exemplo, por uma mutação ou mais raramente, o contrá-

rio. As imprecisões são particularmente mais intensas em áreas de repetições onde se considera não haver genes, ou envolvendo múltiplos nucleotídeos iguais. Ainda, esses bancos de dados gerados podem ser utilizados para interpretação da estrutura cromossomal, e evolução entre organismos, por exemplo. Mas se as próprias seqüências e suas anotações são sujeitas a críticas, uma análise secundária conteria acúmulo de imprecisões de diversos genes levando a uma análise mais arriscada ainda.

As fases abertas de leitura possuem outros fatores que aumentam a evidência de que sejam genes funcionais. Certos elementos são descritos a montante e a jusante das fases abertas de leitura. Em *Leishmania* esses elementos consistem em um dinucleotídeo AG na porção não traduzida 5' e uma trilha de pirimidinas na porção não traduzida 3' (LeBowitz, Smith et al. 1993). O sítio AG e a trilha de pirimidinas são necessários tanto para trans-splicing do miniexon na produção do RNA maduro quanto a adição da cauda de poliadeninas. Ambos estes elementos foram encontrados no seqüenciamento do fragmento T1 a montante e a jusante da ORF2 mas apenas o dinucleotídeo AG a montante da ORF3 (Figura 12).

Fazendo a hipótese de que uma das fases abertas de leitura estaria correlacionada a resistência à terbinafina, a mesma foi testada pela mutagênese insercional. Obteve-se mutantes para a ORF2 e ORF3. A confirmação do sucesso de ambos eventos de transposição foi feita pelo seqüenciamento. Além disso, observou-se a presença do transcrito de 2500pbs no RT-PCR da L82 (ORF2) e foi encontrada fluorescência em transfectantes com a mutagênese insercional da ORF3 em fusão com a GFP. A fluorescência se difundiu sem especificidade no citoplasma da célula. De posse desses dois transfectantes, realizou-se o teste funcional, pelo ensaio de resistência à terbinafina, para determinação de necessidade e/ou suficiência de ca-

da uma das ORF. Constatou-se o prejuízo da resistência a terbinafina na mutagênese insercional da ORF2 e mas não da ORF3.

É possível ainda que a ORF3 não seja um gene. Não possui homologia com outros genes ou proteínas. Não possui trilha de pirimidinas a sua jusante. A maior parte da fase aberta de leitura está incluída na repetição invertida. Não é necessária para resistência à terbinafina. Sua "expressão" em fusão com a GFP, apesar de confirmar a transposição na fase correta de leitura, também não é evidência de que seja um gene. Finalmente apesar de ter sido predita como proteína membranal portadora de uma alfa-hélice de 23 resíduos, alfa-hélice que foi mantida na fusão, foi encontrada em padrão difuso citosólico. Pode simplesmente ter servido como ATG necessário para a expressão do GFP do transposon.

Para confirmar que não houve outras alterações no transfectante T1-500 além da própria transfecção, este foi curado de seu episomo. A perda de resistência à terbinafina mostra que não ocorreu nenhuma outra alteração do genoma do parasita que explicaria a resistência. Conclui-se que a ORF2 é necessária e suficiente para a resistência à terbinafina conferida pela região H. Denominou-se a ORF2 de HTBF.

Para elaborar hipóteses sobre o funcionamento do HTBF partimos para caracterizar o gene HTBF na própria *L. major* e sua presença em outras espécies de *Leishmania*, caracterizar a expressão do HTBF, procurar proteínas homólogas já caracterizadas em outros organismos e predição da estrutura terciária.

Testou-se a hipótese de que o HTBF é conservado e presente em cópia única em outras espécies do mesmo gênero. Encontraram-se homólogos do HTBF em *L. chagasi*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. A complementação da sonda radioativa com a membrana de náilon ocorre por volta da marca 776 kb, o

que corresponde ao cromossomo 23, de 760kb em *L. major*. As hibridações permitiram concluir que HTBF está presente em apenas um cromossomo nas diferentes espécies de *Leishmania*, e provavelmente cromossomos equivalentes. A versão dos *plugs* digeridas com a enzima de restrição *SacI* mostra sinal único para todas as linhagens inferindo-se também que em todas as linhagens, exceto *L. braziliensis* no qual não se observa sinal, o HTBF está presente em uma única cópia. Como a versão não digerida *L. braziliensis* tem homologia suficiente para hibridizar, pode se supor que há um sítio *SacI* na versão do HTBF em *L. braziliensis*. Existem vários hexanucleotídeos presentes no HTBF que têm apenas um diferente do sítio reconhecido pela enzima *SacI*, GAGCTC.

Procurou-se identificar correlação entre expressão do HTBF e resistência. A expressão do HTBF no transcriptoma foi estudada em *northern blot* e RT-PCR em linhagens e transfectantes sensíveis e resistentes. Foi utilizado como controle o próprio gel de eletroforese prévio a sua transferência, ou então hibridação com sonda de actina ou higromicina B. Todos os RNA recuperados foram quantificados por meio da espectrofotometria e diluídos para uma concentração igual. A mesma quantidade de cada amostra foi aplicada sendo confirmada pela intensidade da hibridação com a sonda de actina ou pela intensidade das bandas de RNA ribossômico, que mostrou-se igual em todas as amostras. O *northern blot* permitiu uma análise semiquantitativa da expressão da transcrição dos genes. Observou-se a expressão diferenciada do gene HTBF e da higromicina B nas diferentes amostras. Reforçou-se a hipótese de que a pressão com droga de seleção do epissoma, higromicina B, aumenta a expressão dos genes presentes no epissoma. O sinal do fragmento *Avall* da higromicina B foi proporcional à pressão por droga nos transfectados. O HTBF detectado também foi proporcional à pressão por droga nos transfectantes T1 em

uma banda de 1,9kb. Foi encontrado também no SF-R30 banda de mesmo tamanho, linhagem que adquiriu resistência pela amplificação por mecanismos endógenos da região H. Além da correlação do aumento do sinal com o aumento da concentração da higromicina B encontra-se também uma correlação com o fenótipo de resistência. O transfectante T1-500 apresentou um fenótipo de resistência à terbinafina diferente do transfectante T1-32. Foi encontrado naquele um sinal mais intenso observado no primeiro com a sonda HTBF, ou seja, a maior presença deste RNA no pool de RNA total do que comparado com este.

De acordo com o modelo de expressão de epissomas em *Leishmania*, o epissoma é transcrito por inteiro uma ou mesmo múltiplas vezes (Grondin, Roy et al. 1996), e só então ocorre o processamento, com a divisão das diferentes fases abertas de leitura, splicing do minixon e cauda poli-adenina. Estes fenômenos que são observado no *blot*, são os sinais mais fracos que ocorrem em 5kb (2,8kb do T1 adicionado a 2,1kb do pELHYG) e múltiplos de 5kb, mas que não estão presentes. No transfectante L82-500 pode ser detectado um sinal de 3,9kb que corresponde ao transcrito de 1,9kb das outras linhagens acrescido de 2kb do transposon GFP-KAN mariner.

O sinal do HTBF não foi observado nas linhagens e transfectantes sensíveis a terbinafina no *northern blot*. No entanto, a sensibilidade da detecção de RNA é maior pelo RT-PCR. De fato, observamos que o HTBF é expresso também nas linhagens e transfectantes sensíveis. Infere-se então que esta expressão ocorre em um nível baixo, inferior ao limiar de detecção do método pelo *northern blot*. Outra informação que pode ser tirada é que no transfectante L82-500, além de banda em 500pbs, também é observada outra banda de 2500pbs que corresponde ao tamanho do HTBF em fusão fora de fase com o transposon GFP-KAN mariner de 2kb.

Como já relatado acima, esta linhagem contém o plasmídeo pELHYG-T1::GFP-KAN mariner. Outra consequência deste experimento é a confirmação do mutagênese insercional no L82-500.

Apesar do HTBF ser expresso no transfectante L82-500, este ocorre em níveis próximos aos do transfectante T1-32 e da linhagem selvagem o que não é o suficiente para conferir resistência. Este experimento leva à conclusão que este gene é transcrito e está presente no RNA total em linhagens resistentes e sensíveis e confirma a mutagênese insercional do HTBF no transfectante L82-500. Não houve diferença da expressão do HTBF com transfectantes T1 mantidos com terbinafina ao invés da higromicina B.

Procuramos homologia da proteína predita pela expressão do gene HTBF. O HTBF tem homologia com proteínas identificadas em múltiplos outros organismos e em todos os reinos de seres eucarióticos, mas não em procariotos. Isto aponta para a uma proteína conservada desde a célula eucariótica primitiva, e portanto de uma maquinaria presente desde então. O desenvolvimento de múltiplos compartimentos na célula eucariótica necessitou de sistema de manutenção das características desses compartimentos e de direcionamento de vesículas saindo ou entrando nesses compartimentos. Este grupo de proteínas abrange a família YIP1 cujo protótipo foi descrito em *S. cerevisiae*. A YIP1 interage com proteínas Rab GTPases.

O entendimento da função alocada ao YIP1 em *S. cerevisiae* é necessário para proposição de hipóteses para o funcionamento do HTBF. A família das Rab GTPases é associada a passos específicos de transporte vesicular nas vias secretória e endocítica (Field, Ali et al. 1999). São proteínas que contêm além de quatro domínios de interação com GTP, necessários para a função hidrolítica, outro domínio de ligação com proteínas ativadoras, e uma região C-terminal altamente variável impor-

tante na sua localização. Esta porção, especificamente, os dois últimos resíduos de cisteína, é modificada pela prenilação, neste caso, a adição de um grupamento geranilgeranil. A dupla prenilação é essencial para a levedura e não ocorre interação com o Yip nos casos em que foram testados Ypt sem uma ou ambas cisteínas C-terminais (Calero, Chen et al. 2003). Esta modificação torna a Rab uma proteína associada à membrana. Vesículas de transporte carregam a forma ativada da proteína Rab (ligada a GTP). Após a fusão da vesícula em seu destino, o GTP é hidrolisado, convertendo a proteína Rab em sua forma inativa (ligada a GDP). Uma proteína citosólica, GDI (*GDP dissociation inhibitor*), ao interagir com o grupo hidrofóbico geranilgeranil permite que a proteína Rab torne-se citosólica (Schimmoller, Simon et al. 1998). A Yip tem ação no brotamento vesicular ao recrutar a proteína Rab do citosol, separando-a do GDI. A proteína Rab se associa a membrana por meio da exposição de seus grupos hidrofóbicos. A Yip1 tem ação no momento do brotamento vesicular, tanto na própria capacidade do brotamento quanto na capacitação de sua posterior fusão. Esta capacidade está correlacionada esta interação com proteínas Rab.

Realizamos a análise por extrapolação computacional da estrutura terciária do HTBF. O sistema sosui prevê a presença de 4 alfa-hélices transmembranais de 22 a 23 resíduos. Esta previsão é compartilhada por múltiplas outras proteínas da família YIP, inclusive sendo necessária como um dos quesitos para sua classificação como pertencente à família Yip (Calero, Winand et al. 2002). Apenas com exposição de 1% triton X-100 conseguiu-se separar a proteína Yip em *S. cerevisiae* das membranas, demonstrando realmente ser uma proteína de membrana integral e não apenas uma proteína associada a membrana (Yang, Matern et al. 1998; Matern, Yang et al. 2000; Calero, Whittaker et al. 2001; Heidtman, Chen et al. 2005). O motivo principal, DLYGP desta família define uma das regiões conservadas da proteína

sem variações ou com algumas variações que mantêm a característica do resíduo original. Encontra-se em alguns organismos o motivo ELYGP, onde o ácido aspártico é substituído por um outro aminoácido polar com características semelhantes, o ácido glutâmico.

Pode-se analisar estas trocas por uma escala de potencial substituição de um aminoácido para outro (Betts e Russell 2003). Esta escala tem como premissa que ocorre evolução das proteínas na especiação dos organismos vivos da maneira conservadora, ou seja, onde cada proteína mantém sua estrutura ou função inicial enquanto for essencial. Esta escala contempla se a proteína é membranal ou não. A substituição do ácido aspártico para ácido glutâmico em proteína de membrana tem uma preferência de 8. Em *Leishmania major* o variante encontrado é o DLWGP, onde o aminoácido não polar, tirosina, é substituído por outro aminoácido não polar, o triptofano. Esta substituição, no entanto, é desfavorável com uma preferência de -3, podendo, portanto ter relação com a especificidade de ligante neste organismo. É interessante notar que este motivo e a região flanqueadora que são conservados constituem parte da primeira alfa-hélice. Infere-se que este domínio interage com outras proteínas no interior da membrana lipídica.

Para estudar o mecanismo da resistência da HTBF à terbinafina foram utilizados dois fundamentos. Primeiro, ao conferir resistência a uma determinada droga, uma proteína tem um conjunto definido de possíveis ações (Borst 1991). A homologia do HTBF com o Yip1 de levedura serve como segundo fundamento para formular hipóteses do papel do HTBF na resistência à terbinafina. Duas hipóteses para o mecanismo de resistência foram feitas. A primeira envolve o influxo de cálcio do espaço extracelular para o citosol através de defeitos na membrana celular na ativação do mecanismo de reparo de membrana e a segunda uma resposta inespecífica diri-

gida contra qualquer droga. Ressalta-se que essas hipóteses podem ser insuficientes para explicar a resistência e ainda que hipótese não excluiria a outra, podendo ser possível que ambas aconteçam.

A primeira hipótese trabalhada é que a interferência de terbinafina na biossíntese de ergosterol pode levar ao uso de esteróides não específicos para a formação da membrana. Isto teria como consequência uma deterioração no funcionamento desta. A ruptura da membrana plasmática que se seguir deveria ser reparada por mecanismos de re-selagem de membrana, através da maquinaria de reparo de membrana (Togo, Alderton et al. 2003). Foi sugerido que a exocitose dependente do influxo de cálcio é essencial na manutenção da integridade da membrana celular por diminuir a tensão superficial, uma vez que a própria ruptura da membrana leva a um influxo de cálcio (Schimmoller, Simon et al. 1998). Além disso, isto é necessário para desencadear o recrutamento de vesículas, ou seja, mecanismo de reparo da membrana, e é antagonizado pelo influxo de magnésio (McNeil e Steinhardt 1997). De fato, toxinas proteolíticas, que clivam especificamente as SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) também bloqueiam a exocitose e inibem a reparação da membrana. Reforçando a hipótese, existe um modelo semelhante onde foi descrito uma linhagem de *S. cerevisiae* com mutação em um gene da via metabólica do ergosterol, a C14-esterol redutase, que é dependente de cálcio (Crowley, Tove et al. 1998). Estudos em outra linhagem de levedura mutante de *ypt*, sensível condicionalmente à temperatura, mostraram que o fenótipo alterado de crescimento poderia ser curado pelo aumento extracelular de cálcio (Schmitt, Puzicha et al. 1988). Estas observações indicam que o aumento dos níveis externos de íons de cálcio poderia curar mutantes da biossíntese do ergosterol, ou vias de atracamento vesicular, por desencadeamento da maquinaria reparadora da

membrana. Portanto, a interferência da terbinafina na biossíntese do ergosterol poderia ser diminuída pela ativação da maquinaria de reparação de membrana pelo aumento da expressão do gene HTBF.

Propõe-se a hipótese de que o cálcio é essencial para a resistência à terbinafina. Para este teste foi utilizado um quelante de cálcio, o EGTA. Primeiramente foi determinado o nível em que o EGTA teria ação tóxica diretamente ao parasita. Constatamos que a partir de 1mM de EGTA havia interferência em seu crescimento. Esta foi a concentração usada em uma repetição das curvas de crescimento, na presença ou na ausência deste quelante. Observou-se a perda do fenótipo de resistência no transfectante T1-500 com a presença de EGTA, mostrando que a presença de cálcio é necessária para a resistência, confirmando a hipótese.

A segunda hipótese feita para a resistência à terbinafina envolve uma resposta generalizada contra múltiplos tipos de droga. Estudos da resistência a metais pesados em *Leishmania* mediados pelo transportador MRPA levaram à sugestão que esta proteína age sobre conjugados metal-tiol (Legare, Richard et al. 2001). A localização do MRPA revelou que a proteína é integral membranal, estando presente em membranas intracelulares em estruturas túbulo-vesiculares próximas à bolsa flagelar. Não foi demonstrado, mas propõe-se que possam participar de vias exocíticas em *Leishmania*. Esses achados indicam que MRPA confere resistência pelo seqüestro de drogas para vesículas que por outros mecanismos seriam eliminados da célula pela exocitose através da bolsa flagelar. O HTBF poderia melhorar o processo de tráfego e atracamento vesicular tornando a extrusão de drogas mais eficiente. Deve ser destacado o fato que *amplicons* derivados da região H da *L. tarentolae* contendo MRPA provavelmente carregam o gene HTBF que, em *L. major*, está localizado a 2.2kb a jusante do MRPA.

Para testar esta hipótese realizou-se o ensaio de resistência a outra droga na presença da superexpressão do HTBF. No transfectante T1-500 foi então transfectado o pxMRPA. Foram realizadas curvas de crescimento na presença de antimônio trivalente. O co-transfectante HTBF/pxMRPA, apesar de apresentar resistência significativa ao antimonial em relação ao selvagem, não apresentou o mesmo nível de resistência do transfectante pxMRPA puro. Esta resistência foi cinco vezes menor, mostrando uma interação antagonizante na dupla superexpressão desses genes na resistência ao antimonial. A localização do HTBF no complexo de Golgi onde provavelmente não interage com o MRPA é indício de que a interferência seja indireta (Legare, Richard et al. 2001). O T1-500 ainda possui uma resistência discreta ao antimonial com fator de resistência de 2,0 que tem significância estatística. Esta resistência é comparável a própria resistência consistentemente demonstrada à terbinafina.

Isto indica que não há sinergismo entre a resistência ao antimonial e a superexpressão isolada do HTBF. Pode estar ocorrendo uma competição entre diferentes sinalizações de tráfego intracelular comprometendo a capacidade de resistência ao antimonial.

O estudo da localização do HTBF pode proporcionar ainda novas pistas sobre seu funcionamento. Por meio de microscopia confocal de fluorescência, o GFP em fusão com o HTBF serviu para a localização subcelular do HTBF. Estas fusões podem ocorrer nas extremidades N-terminal e C-terminal. Apesar do tamanho da GFP de 238 amino ácidos, proteínas geradas com a sua fusão podem reter suas características funcionais, ou seja, pode ou não ocorrer interação dos resíduos que constituem a GFP a domínios funcionais próximos ao local de fusão, ou ainda com sinais localizatórios presentes nestas extremidades. Há descrições de fusões em

ambas as extremidades com manutenção, perda ou ainda alteração da função (Meyer e Fromherz 1999; Besteiro, Coombs et al. 2006; Zhang e Crandall 2007). Obtivemos duas fusões, uma pela transposição no terço inicial do HTBF, perdendo dois terços da extremidade C-terminal e a segunda fusão no N-terminal, foi construída de modo a manter a quase totalidade do HTBF. As fusões foram submetidas ao algoritmo sosui para predição de alfa-hélices. Encontrou-se que a primeira fusão ocorre antes da formação de qualquer alfa-hélice da proteína original, levando a uma proteína com perfil solúvel. A segunda fusão foi construída na extremidade N-terminal, sem perda de nenhuma das alfa-hélices.

A primeira fusão é encontrada, como esperado, de forma difusa pelo citoplasma. A segunda fusão foi encontrada de forma localizada na célula, em uma estrutura próxima entre o núcleo e a membrana plasmática no polo flagelar, estrutura onde preferencialmente ocorre a endocitose e secreção do parasita (Landfear e Ignatushchenko 2001). As fusões foram efetivas em localizar a porção do HTBF que permaneceu na fusão. As predições de alfa-hélice correlacionaram a localização subcelular específica e não difusa pela célula. De forma oposta à fusão realizada com a ORF3, esta se localizou em um compartimento específico, mesmo retendo seus domínios previstos de alfa-hélices. Corrobora de mais uma forma que o HTBF é de fato um gene funcional, ao contrário da ORF3.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts e P. Walter (2002). Molecular biology of the cell. New York, Garland Science.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers e D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.
- Augusto, M. J., F. M. Squina, J. F. Marchini, F. C. Dias e L. R. Tosi (2004). "Specificity of modified Drosophila mariner transposons in the identification of Leishmania genes." Exp Parasitol **108**(3-4): 109-13.
- Bello, A. R., B. Nare, D. Freedman, L. Hardy e S. M. Beverley (1994). "PTR1: a reductase mediating salvage of oxidized pteridines and methotrexate resistance in the protozoan parasite Leishmania major." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(24): 11442-6.
- Berhe, N., Y. Abraham, A. Hailu, A. Ali, G. Mengistu, K. Tsige e Y. Abebe (2001). "Electrocardiographic findings in Ethiopians on pentavalent antimony therapy for visceral leishmaniasis." East Afr Med J **78**(11): 608-10.
- Berman, J. D. (1988). "Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies." Rev Infect Dis **10**(3): 560-86.
- Besteiro, S., G. H. Coombs e J. C. Mottram (2006). "The SNARE protein family of Leishmania major." BMC Genomics **7**: 250.
- Betts, M. e R. Russell (2003). Amino acid properties and consequences of substitutions. Bioinformatics for Geneticists. Wiley.
- Beverley, S. M. (1988). "Characterization of the 'unusual' mobility of large circular DNAs in pulsed field-gradient electrophoresis." Nucleic Acids Res **16**(3): 925-39.
- Beverley, S. M. (1991). "Gene amplification in Leishmania." Annu Rev Microbiol **45**: 417-44.
- Beverley, S. M., J. A. Coderre, D. V. Santi e R. T. Schimke (1984). "Unstable DNA amplifications in methotrexate-resistant Leishmania consist of extrachromosomal circles which relocalize during stabilization." Cell **38**(2): 431-9.
- Biedler, J. L. (1992). "Genetic aspects of multidrug resistance." Cancer **70**(6 Suppl): 1799-809.
- Birnboim, H. C. e J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Borst, P. (1991). "Genetic mechanisms of drug resistance. A review." Acta Oncol **30**(1): 87-105.

- Brochu, C., J. Wang, G. Roy, N. Messier, X. Y. Wang, N. G. Saravia e M. Ouellette (2003). "Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites." Antimicrob Agents Chemother **47**(10): 3073-9.
- Buvelot Frei, S., P. B. Rahl, M. Nussbaum, B. J. Briggs, M. Calero, S. Janeczko, A. D. Regan, C. Z. Chen, Y. Barral, G. R. Whittaker e R. N. Collins (2006). "Bioinformatic and comparative localization of Rab proteins reveals functional insights into the uncharacterized GTPases Ypt10p and Ypt11p." Mol Cell Biol **26**(19): 7299-317.
- Calero, M., C. Z. Chen, W. Zhu, N. Winand, K. A. Havas, P. M. Gilbert, C. G. Burd e R. N. Collins (2003). "Dual prenylation is required for Rab protein localization and function." Mol Biol Cell **14**(5): 1852-67.
- Calero, M., G. R. Whittaker e R. N. Collins (2001). "Yop1p, the yeast homolog of the polyposis locus protein 1, interacts with Yip1p and negatively regulates cell growth." J Biol Chem **276**(15): 12100-12.
- Calero, M., N. J. Winand e R. N. Collins (2002). "Identification of the novel proteins Yip4p and Yip5p as Rab GTPase interacting factors." FEBS Lett **515**(1-3): 89-98.
- Callahan, H. L. e S. M. Beverley (1991). "Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*." J Biol Chem **266**(28): 18427-30.
- Callahan, H. L. e S. M. Beverley (1992). "A member of the aldoketo reductase family confers methotrexate resistance in *Leishmania*." J Biol Chem **267**(34): 24165-8.
- Cavalier-Smith, T. (1998). "A revised six-kingdom system of life." Biol Rev Camb Philos Soc **73**(3): 203-66.
- Cavalier-Smith, T. (2003). "Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa." European Journal of Protistology **39**(4): 338-48.
- Cecil, R., L. Goldman e J. Bennet (2000). Cecil Textbook of Medicine. Hold, WB Saunders.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward e D. C. Prasher (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." Science **263**(5148): 802-5.
- Chomczynski, P. e N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Clayton, C., M. Adams, R. Almeida, T. Baltz, M. Barrett, P. Bastien, S. Belli, S. Beverley, N. Biteau, J. Blackwell, C. Blaineau, M. Boshart, F. Bringaud, G. Cross, A. Cruz, W. Degrave, J. Donelson, N. El-Sayed, G. Fu, K. Ersfeld, W.

- Gibson, K. Gull, A. Ivens, J. Kelly, L. Vanhamme e et al. (1998). "Genetic nomenclature for Trypanosoma and Leishmania." Mol Biochem Parasitol **97**(1-2): 221-4.
- Clayton, C. E. (2002). "Life without transcriptional control? From fly to man and back again." Embo J **21**(8): 1881-8.
- Coburn, C. M., K. M. Otteman, T. McNeely, S. J. Turco e S. M. Beverley (1991). "Stable DNA transfection of a wide range of trypanosomatids." Mol Biochem Parasitol **46**(1): 169-79.
- Coelho, A. C., E. H. Yamashiro-Kanashiro, S. F. Bastos, R. A. Mortara e P. C. Cotrim (2006). "Intracellular location of the ABC transporter PRP1 related to pentamidine resistance in Leishmania major." Mol Biochem Parasitol **150**(2): 378-83.
- Cotrim, P. C., L. K. Garritty e S. M. Beverley (1999). "Isolation of genes mediating resistance to inhibitors of nucleoside and ergosterol metabolism in Leishmania by overexpression/selection." J Biol Chem **274**(53): 37723-30.
- Croft, S. L. (2001). "Monitoring drug resistance in leishmaniasis." Trop Med Int Health **6**(11): 899-905.
- Croft, S. L., S. Sundar e A. H. Fairlamb (2006). "Drug resistance in leishmaniasis." Clin Microbiol Rev **19**(1): 111-26.
- Crowley, J. H., S. Tove e L. W. Parks (1998). "A calcium-dependent ergosterol mutant of Saccharomyces cerevisiae." Curr Genet **34**(2): 93-9.
- Cruz, A. e S. M. Beverley (1990). "Gene replacement in parasitic protozoa." Nature **348**(6297): 171-3.
- Cruz, A. K. e L. R. Tosi (1996). "Molecular biology." Clin Dermatol **14**(5): 533-40.
- Cruz, I., M. A. Morales, I. Nogueira, A. Rodriguez e J. Alvar (2002). "Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users." Lancet **359**(9312): 1124-5.
- Cruz, I., J. Nieto, J. Moreno, C. Canavate, P. Desjeux e J. Alvar (2006). "Leishmania/HIV co-infections in the second decade." Indian J Med Res **123**(3): 357-88.
- Cubitt, A. B., R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross e R. Y. Tsien (1995). "Understanding, improving and using green fluorescent proteins." Trends Biochem Sci **20**(11): 448-55.
- Cuce, L. C., W. Belda Junior e M. C. Dias (1990). "Alterações renais por hipersensibilidade ao uso de antimonial pentavalente (Glucantime®) na leishmaniose tegumentar americana. Relato de um caso." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **32**(4): 249-51.

- Cunningham, M. L., R. G. Titus, S. J. Turco e S. M. Beverley (2001). "Regulation of differentiation to the infective stage of the protozoan parasite *Leishmania major* by tetrahydrobiopterin." Science **292**(5515): 285-7.
- CVE, S. D. Z.-. (2005). Casos de Leishmaniose Tegumentar no Estado de São Paulo por Ano de Ocorrência e Município do Estado. São Paulo.
- Dacks, J. B. e W. F. Doolittle (2001). "Reconstructing/deconstructing the earliest eukaryotes: how comparative genomics can help." Cell **107**(4): 419-25.
- Dias, F. C., J. C. Ruiz, W. C. Lopes, F. M. Squina, A. Renzi, A. K. Cruz e L. R. Tosi (2007). "Organization of H locus conserved repeats in *Leishmania (Viannia) braziliensis* correlates with lack of gene amplification and drug resistance." Parasitol Res **101**(3): 667-76.
- Divisão de Zoonoses e DIRs VI, X., XIV (2005). Casos Autóctones e Óbitos de Leishmaniose Visceral Americana, segundo Município de Residência 1999 - 2005.
- Ellenberger, T. E. e S. M. Beverley (1989). "Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*." J Biol Chem **264**(25): 15094-103.
- Feinberg, A. P. e B. Vogelstein (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." Anal Biochem **132**(1): 6-13.
- Fernandes, N. C., I. Morgan, J. P. Maceira, T. Cuzzi e R. A. M. Noe (2004). "American tegumentary Leishmaniasis: hospitalized cases in Rio de Janeiro." Anais Brasileiros de Dermatologia **79**(4): 431-9.
- Field, M. C., B. R. Ali e H. Field (1999). "GTPases in protozoan parasites: tools for cell biology and chemotherapy." Parasitol Today **15**(9): 365-71.
- Gallwitz, D., C. Donath e C. Sander (1983). "A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-ha/bas proto-oncogene product." Nature **306**(5944): 704-7.
- Garraway, L. A., L. R. Tosi, Y. Wang, J. B. Moore, D. E. Dobson e S. M. Beverley (1997). "Insertional mutagenesis by a modified in vitro Ty1 transposition system." Gene **198**(1-2): 27-35.
- Giannini, S. H., M. Schittini, J. S. Keithly, P. W. Warburton, C. R. Cantor e L. H. Van der Ploeg (1986). "Karyotype analysis of *Leishmania* species and its use in classification and clinical diagnosis." Science **232**(4751): 762-5.
- Gramiccia, M. e L. Gradoni (2005). "The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control." Int J Parasitol **35**(11-12): 1169-80.
- Grondin, K., A. Haimeur, R. Mukhopadhyay, B. P. Rosen e M. Ouellette (1997). "Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene gsh1 and of the

ABC transporter gene *pgpA* in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*." Embo J **16**(11): 3057-65.

Grondin, K., G. Roy e M. Ouellette (1996). "Formation of extrachromosomal circular amplicons with direct or inverted duplications in drug-resistant *Leishmania tarentolae*." Mol Cell Biol **16**(7): 3587-95.

Heidtman, M., C. Z. Chen, R. N. Collins e C. Barlowe (2005). "Yos1p is a novel subunit of the Yip1p-Yif1p complex and is required for transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex." Mol Biol Cell **16**(4): 1673-83.

Hennekens, C., J. Buring e S. Mayrent (1987). Epidemiology in Medicine, Lippincott Williams & Wilkins.

Hirokawa, T., S. Boon-Chieng e S. Mitaku (1998). "SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins." Bioinformatics **14**(4): 378-9.

Ivens, A. C., C. S. Peacock, E. A. Worthey, L. Murphy, G. Aggarwal, M. Berriman, E. Sisk, M. A. Rajandream, E. Adlem, R. Aert, A. Anupama, Z. Apostolou, P. Attipoe, N. Bason, C. Bauser, A. Beck, S. M. Beverley, G. Bianchetti, K. Borzym, G. Bothe, C. V. Bruschi, M. Collins, E. Cadag, L. Ciarloni, C. Clayton, R. M. Coulson, A. Cronin, A. K. Cruz, R. M. Davies, J. De Gaudenzi, D. E. Dobson, A. Duesterhoeft, G. Fazelina, N. Fosker, A. C. Frasch, A. Fraser, M. Fuchs, C. Gabel, A. Goble, A. Goffeau, D. Harris, C. Hertz-Fowler, H. Hilbert, D. Horn, Y. Huang, S. Klages, A. Knights, M. Kube, N. Larke, L. Litvin, A. Lord, T. Louie, M. Marra, D. Masuy, K. Matthews, S. Michaeli, J. C. Mottram, S. Muller-Auer, H. Munden, S. Nelson, H. Norbertczak, K. Oliver, S. O'Neil, M. Pentony, T. M. Pohl, C. Price, B. Purnelle, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, R. Reinhardt, M. Rieger, J. Rinta, J. Robben, L. Robertson, J. C. Ruiz, S. Rutter, D. Saunders, M. Schafer, J. Schein, D. C. Schwartz, K. Seeger, A. Seyler, S. Sharp, H. Shin, D. Sivam, R. Squares, S. Squares, V. Tosato, C. Vogt, G. Volckaert, R. Wambutt, T. Warren, H. Wedler, J. Woodward, S. Zhou, W. Zimmermann, D. F. Smith, J. M. Blackwell, K. D. Stuart, B. Barrell e P. J. Myler (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*." Science **309**(5733): 436-42.

Kapler, G. M., C. M. Coburn e S. M. Beverley (1990). "Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression." Mol Cell Biol **10**(3): 1084-94.

Keeling, P. J., G. Burger, D. G. Durnford, B. F. Lang, R. W. Lee, R. E. Pearlman, A. J. Roger e M. W. Gray (2005). "The tree of eukaryotes." Trends Ecol Evol **20**(12): 670-6.

Koff, A. B. e T. Rosen (1994). "Treatment of cutaneous leishmaniasis." J Am Acad Dermatol **31**(5 Pt 1): 693-708; quiz -10.

- Lainson, R., L. Ryan e J. J. Shaw (1987). "Infective stages of Leishmania in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission." Mem Inst Oswaldo Cruz **82**(3): 421-4.
- Landfear, S. M. e M. Ignatushchenko (2001). "The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids." Mol Biochem Parasitol **115**(1): 1-17.
- Lazar, T., M. Gotte e D. Gallwitz (1997). "Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell?" Trends Biochem Sci **22**(12): 468-72.
- LeBowitz, J. H., H. Q. Smith, L. Rusche e S. M. Beverley (1993). "Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in Leishmania." Genes Dev **7**(6): 996-1007.
- Legare, D., D. Richard, R. Mukhopadhyay, Y. D. Stierhof, B. P. Rosen, A. Haimeur, B. Papadopoulou e M. Ouellette (2001). "The Leishmania ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase." J Biol Chem **276**(28): 26301-7.
- Levin, B. R. (1996). "The evolution and maintenance of virulence in microparasites." Emerg Infect Dis **2**(2): 93-102.
- Leyden, J. (1998). "Pharmacokinetics and pharmacology of terbinafine and itraconazole." J Am Acad Dermatol **38**(5 Pt 3): S42-7.
- Malik, A. N., L. John, A. D. Bruce e D. N. Lockwood (2006). "Changing pattern of visceral leishmaniasis, United Kingdom, 1985-2004." Emerg Infect Dis **12**(8): 1257-9.
- Marchini, J. F., A. K. Cruz, S. M. Beverley e L. R. Tosi (2003). "The H region HTBF gene mediates terbinafine resistance in Leishmania major." Mol Biochem Parasitol **131**(1): 77-81.
- Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, P. F. Cherukuri, C. DeWeese-Scott, L. Y. Geer, M. Gwadz, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. Ke, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, F. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, B. A. Shoemaker, V. Simonyan, J. S. Song, P. A. Thiessen, R. A. Yamashita, J. J. Yin, D. Zhang e S. H. Bryant (2005). "CDD: a Conserved Domain Database for protein classification." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D192-6.
- Matern, H., X. Yang, E. Andrulis, R. Sternglanz, H. H. Trepte e D. Gallwitz (2000). "A novel Golgi membrane protein is part of a GTPase-binding protein complex involved in vesicle targeting." Embo J **19**(17): 4485-92.
- McNeil, P. L. e R. A. Steinhardt (1997). "Loss, restoration, and maintenance of plasma membrane integrity." J Cell Biol **137**(1): 1-4.
- Meyer, E. e P. Fromherz (1999). "Ca²⁺ activation of hSlo K⁺ channel is suppressed by N-terminal GFP tag." Eur J Neurosci **11**(3): 1105-8.

- Myler, P. J., S. M. Beverley, A. K. Cruz, D. E. Dobson, A. C. Ivens, P. D. McDonagh, R. Madhubala, S. Martinez-Calvillo, J. C. Ruiz, A. Saxena, E. Sisk, S. M. Sun-kin, E. Worthey, S. Yan e K. D. Stuart (2001). "The Leishmania genome project: new insights into gene organization and function." Med Microbiol Immunol **190**(1-2): 9-12.
- Name, R. Q., K. T. Borges, L. S. C. Nogueira, J. H. Sampaio, P. L. Tauli e R. N. R. Sampaio (2005). "Clinical, epidemiological and therapeutic study of 402 patients with american cutaneous leishmaniasis attended at University Hospital of Brasilia, DF, Brazil." Anais Brasileiros de Dermatologia **80**(3): 249-54.
- Novick, P. e M. Zerial (1997). "The diversity of Rab proteins in vesicle transport." Curr Opin Cell Biol **9**(4): 496-504.
- Ortega-Carnicer, J., R. Alcazar, M. De la Torre e J. Benezet (1997). "Pentavalent antimonial-induced torsade de pointes." J Electrocardiol **30**(2): 143-5.
- Ouellette, M., J. Drummelsmith e B. Papadopoulou (2004). "Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments." Drug Resist Updat **7**(4-5): 257-66.
- Pastorino, A. C., C. M. Jacob, G. W. Oselka e M. M. Carneiro-Sampaio (2002). "[Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects]." J Pediatr (Rio J) **78**(2): 120-7.
- Paula, C. D., J. H. Sampaio, D. R. Cardoso e R. N. Sampaio (2003). "Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mg SbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana." Rev Soc Bras Med Trop **36**(3): 365-71.
- Peacock, C. S. (2007). "The practical implications of comparative kinetoplastid genomics." SEB Exp Biol Ser **58**: 25-45.
- Rangel, H., F. Dagger, A. Hernandez, A. Liendo e J. A. Urbina (1996). "Naturally azole-resistant Leishmania braziliensis promastigotes are rendered susceptible in the presence of terbinafine: comparative study with azole-susceptible Leishmania mexicana promastigotes." Antimicrob Agents Chemother **40**(12): 2785-91.
- Rey, L. (2001). Parasitologia: parasitas e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Ryan, K. A., S. Dasgupta e S. M. Beverley (1993). "Shuttle cosmid vectors for the trypanosomatid parasite Leishmania." Gene **131**(1): 145-50.
- Ryder, N. S. (1992). "Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition." Br J Dermatol **126 Suppl 39**: 2-7.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch e T. Maniatis (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., S. Nicklen e A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Savani, E. S., B. Schimonsky, M. C. Camargo e R. D'Auria S (2003). "Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo." Rev Saude Publica **37**(2): 260-2.
- Schimmoller, F., I. Simon e S. R. Pfeffer (1998). "Rab GTPases, directors of vesicle docking." J Biol Chem **273**(35): 22161-4.
- Schinkel, A. H. (1997). "The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins." Semin Cancer Biol **8**(3): 161-70.
- Schmitt, H. D., M. Puzicha e D. Gallwitz (1988). "Study of a temperature-sensitive mutant of the ras-related YPT1 gene product in yeast suggests a role in the regulation of intracellular calcium." Cell **53**(4): 635-47.
- Schwartz, D. C. e C. R. Cantor (1984). "Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis." Cell **37**(1): 67-75.
- Segura, I. e I. Garcia-Bolao (1999). "Meglumine antimoniate, amiodarone and torsades de pointes: a case report." Resuscitation **42**(1): 65-8.
- Sereno, D., M. Cavaleyra, K. Zemzoumi, S. Maquaire, A. Ouaisi e J. L. Lemesre (1998). "Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action." Antimicrob Agents Chemother **42**(12): 3097-102.
- Smith, C. A. e E. N. Baker (2002). "Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation." Curr Drug Targets Infect Disord **2**(2): 143-60.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." J Mol Biol **98**(3): 503-17.
- Sundar, S., K. Pai, R. Kumar, K. Pathak-Tripathi, A. A. Gam, M. Ray e R. T. Kenney (2001). "Resistance to treatment in Kala-azar: speciation of isolates from northeast India." Am J Trop Med Hyg **65**(3): 193-6.
- Togo, T., J. M. Alderton e R. A. Steinhardt (2003). "Long-term potentiation of exocytosis and cell membrane repair in fibroblasts." Mol Biol Cell **14**(1): 93-106.
- Tosi, L. R. e S. M. Beverley (2000). "cis and trans factors affecting Mos1 mariner evolution and transposition in vitro, and its potential for functional genomics." Nucleic Acids Res **28**(3): 784-90.

- Vandenplas, S., I. Wiid, A. Grobler-Rabie, K. Brebner, M. Ricketts, G. Wallis, A. Bester, C. Boyd e C. Mathew (1984). "Blot hybridisation analysis of genomic DNA." J Med Genet **21**(3): 164-72.
- Veronesi, R. e R. Focaccia (2002). Tratado de Infectologia. São Paulo, Atheneu.
- Wincker, P., C. Ravel, C. Britto, P. Dubessay, P. Bastien, M. Pages e C. Blaineau (1997). "A direct method for the chromosomal assignment of DNA markers in Leishmania." Gene **194**(1): 77-80.
- Wyllie, S., M. L. Cunningham e A. H. Fairlamb (2004). "Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen Leishmania donovani." J Biol Chem **279**(38): 39925-32.
- Yang, X., H. T. Matern e D. Gallwitz (1998). "Specific binding to a novel and essential Golgi membrane protein (Yip1p) functionally links the transport GTPases Ypt1p and Ypt31p." Embo J **17**(17): 4954-63.
- Zhang, J. e I. Crandall (2007). "Expression of both N- and C-terminal GFP tagged huCD36 and their discrepancy in OxLDL and pRBC binding on CHO cells." Lipids Health Dis **6**: 24.

10. ÍNDICE DE ANEXOS

1. Marchini, J. F., A. K. Cruz, S. M. Beverley e L. R. Tosi (2003). "The H region HTBF gene mediates terbinafine resistance in *Leishmania major*." Mol Biochem Parasitol **131**(1): 77-81. 130
2. Augusto, M. J., F. M. Squina, J. F. Marchini, F. C. Dias e L. R. Tosi (2004). "Specificity of modified *Drosophila* mariner transposons in the identification of *Leishmania* genes." Exp Parasitol **108**(3-4): 109-13. 135
3. [manuscrito] Marchini, J.F. e L. R. Tosi. "As interações da proteína Yip1p em *S. cerevisiae* e seu papel no transporte vesicular" 140
4. [manuscrito] Pinto, M.R.*, Marchini, J.F.*, Buranello, P.A., Oliver, C., Mortara, R.A. e L.R. Tosi. "The *Leishmania major* HTBF protein belongs in the Yip family of proteins." 184

Short communication

The H region *HTBF* gene mediates terbinafine resistance
in *Leishmania major*Julio F.M. Marchini^a, Angela K. Cruz^a, Stephen M. Beverley^b, Luiz R.O. Tosi^{a,*}^a Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ave. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto—SP, Brazil^b Department of Molecular Microbiology, Washington University Medical School, 660 South Euclid Ave., St. Louis, MO 63110, USA

Received 15 March 2003; received in revised form 23 June 2003; accepted 30 June 2003

Keywords: *Leishmania*; Terbinafine resistance; H region; Gene amplification; In vitro transposition

Leishmania spp. are the causative agent of leishmaniasis, a disease that has an estimated global prevalence of 12 million cases [1]. The disease has a broad spectrum of clinical presentations, from skin and subcutaneous lesions to visceral disease. The mainstream treatment for leishmaniasis consists of parenteral administration of pentavalent antimonials, which may result in dose-cumulative side effects. Amphotericin B is an even more toxic and less effective alternative. For the treatment of complex cases, inhibitors of the sterol biosynthesis pathway, such as terbinafine, offer an attractive possibility as they target parasite-specific physiological aspects [2].

The study of the ability of this organism to evade chemotherapy is important not only to understand different aspects of this protozoan's biology but also to help the design of effective treatments. Gene amplification is a common mechanism used for survival in *Leishmania* strains selected for resistance to drugs such as methotrexate [3]. *Leishmania major* selected in methotrexate, primaquine, or pentavalent antimonials derive resistance to these drugs through the amplification of a 48 kb locus in chromosome 23, the H region. P-glycoprotein A (*PGPA*) and Pteridine reductase 1 (*PTR1*) are the two genes related to drug resistance that have been identified within the H region. *PGPA* is an ATP-binding cassette which renders the parasite re-

sistant to heavy metals (arsenite and antimonials) through a still unclear mechanism [4–6]. The alternative pteridine reductase *PTR1* confers resistance to methotrexate, and has been shown to limit pathogenesis within the mammalian host [7–9]. *L. major* subject to drug pressure may become resistant to terbinafine through H region amplification, as observed in cell lines SF-R30 (selected in terbinafine) and PQ-R10 (selected in primaquine) [3]. Terbinafine is an antifungal drug that is capable of inhibiting squalene-epoxidase [10], a key enzyme in the biosynthesis of ergosterol, an essential component of the cell membrane. Terbinafine toxicity thus arises from ergosterol deficiency and squalene accumulation [11,12]. While the genes mediating resistance to other agents that induce H region amplification have been identified, terbinafine resistance has not been mapped yet.

The effects of terbinafine on the parasite growth are complex and were shown to elicit resistance. The identification of a terbinafine-resistance gene present within the H region took advantage of a strategy based upon gene inactivation through insertional mutagenesis and its correlation with loss of phenotype. Considering the 48 kb span of the H locus, the resistance phenotype was constrained to a smaller fragment in order to reduce the number of genes to be inactivated by the insertional mutagenesis protocol. The H region had already been divided into four fragments cloned into the shuttle vector pSNAR [13]. Terbinafine resistance was assessed using not only *L. major* transfectants bearing each of the four clones, but also the SF-R30 strain and the wild-type cell line LT252 as positive and negative controls, respectively. The fold resistance at EC₅₀ for these lines is presented in Fig. 1B. Transfectants bearing the H region subfragments H1, H2, and H3 were not different from the wild-type cell line. However, the fold resistance exhibited by transfectant

Abbreviations: PCR, polymerase chain reaction; GFP, green fluorescent protein; RTPCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction; PFGE, pulse field gel electrophoresis; YIP, YPT interacting protein; *PGPA*, P-glycoprotein A; *PTR1*, Pteridine reductase 1; ORF, open reading frame; MOPS, 3-[N-morpholino] propane-sulfonic acid; *HTBF*, H region associated terbinafine resistance; *SNARE*, soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors

* Corresponding author. Tel.: +55-16-602-3117; fax: +55-16-633-1786.

E-mail address: luiztosi@fmrp.usp.br (L.R.O. Tosi).

Fig. 1. Delimitation of the terbinafine-resistance gene within the H region. (A) *SacI* fragments of H4 (T1, T2, and T4) were subcloned into pELHYG and tested for terbinafine resistance; plus and minus signs represent resistance and sensitivity, respectively; black arrows represent inverted repeats (T3a and T3b); S = *SacI* site; sequencing of T1 revealed two complete open reading frames indicated by white arrows; the arrows on HTBF represent the placement of mariner transposon insertion events; the insertion named 82 was used to originate the L82 transfectant. (B and C) Fold resistance of *L. major* cell lines and transfectants at EC₅₀ for terbinafine relative to that of the wild-type LT252, CC1 clone (MHOM/IR/84/LT 252); log-phase cells were seeded at a cell density of 10⁵ cells ml⁻¹ into drug-free medium as well as in media containing terbinafine ranging from 2 to 8 µg ml⁻¹; the drug-free culture growth was monitored daily until it reached late-log phase (0.8 to 1.0 × 10⁷ cells ml⁻¹), when the terbinafine EC₅₀ was determined as the concentration that decreased the cell growth rate by 50%; mean and S.D. are shown; *Values significantly higher than the wild-type value by Student's *t* test (*P* < 0.05); **Values significantly higher than all other lines and transfectants by Student's *t* test (*P* < 0.05). Terbinafine resistant cell lines were SF-R30 and PQ-R10 [3]; stable transfectants were initially selected on 32 µg ml⁻¹ of hygromycin B and increased to 500 µg ml⁻¹ in indicated transfectants by doubling steps; transfectants were named according to Clayton et al [27]; The fold-resistance is the ratio of terbinafine EC₅₀s for experimental and LT252 cells, measured in the same experiment^a.

H4 (LT[pSNAR⁸H4]) was comparable to that of the resistant cell line PQ-R10 and significantly higher than that observed for wild-type cells (*P* < 0.05). Although fold resistance is typically low (about two-fold), it is consistently found in terbinafine resistant lines regardless of the selective force leading to H region amplification. The cell lines selected in terbinafine are an exception in which the fold resistance is significantly higher [3]. Different mechanisms might play a role in bringing about terbinafine resistance. In fact, *Leishmania* resistance to sterol biosynthesis inhibitors can be achieved by the expression of many loci [14], including the H locus, as shown in SF-R30 and PQ-R10 lines. Therefore, we cannot exclude the possibility that terbinafine selected cell lines, such as SF-R30, have developed differ-

ent mechanisms of terbinafine resistance in addition to the amplification of the H locus.

In order to limit the locus that has imparted terbinafine resistance to *Leishmania*, the H4 fragment was restricted with *SacI*, which generated five fragments (Fig. 1A). Two of the resulting fragments encompass the inverted repeats present in the right end of the H locus. The remaining fragments were subcloned into shuttle vectors pELHYG or pELHYGII and transfected into the parasite. *L. major* transfectants T1 (LT[pELHYG³²T1]) and T4 (LT[pELHYGII³²T4]) were isolated and kept under 32 µg ml⁻¹ hygromycin B. The concentration of hygromycin B in culture was raised to 500 µg ml⁻¹ in doubling steps so as to increase the plasmid copy number. The transfectants T1₅₀₀ (LT[pELHYG⁵⁰⁰T1]) and T4₅₀₀

(LT[pELHYG⁵⁰⁰T4]) allowed the analysis of the effect of this phenomenon on the terbinafine-resistance phenotype. Control cell lines, as well as the different transfectants noted above, were used in a terbinafine resistance-assay (Fig. 1C). The fold resistance of transfectants T4₅₀₀ and T1₃₂ was not different from that observed for the wild-type cells. Nevertheless, the transfectant T1₅₀₀ exhibited a fold resistance that was significantly higher than that observed for wild-type cells and comparable to that exhibited by the transfectant H4. These results not only consistently linked the resistance phenotype to the H locus, but also narrowed the search for the resistance gene to only 2.8 kb contained in T1 fragment. Primer-island sequencing of the segment cloned into pELHYG revealed two complete open reading frames (ORFs) within the T1 locus (accession number AY227807). ORF2 and ORF3 had typical upstream and downstream putative AG *trans*-splicing acceptor sites and pyrimidine-rich tracks [15]. An incomplete open reading frame, ORF1, lacking a 5'-end was identified upstream of ORF2. Comparison with the public sequence databases revealed the homology of the 570 bp ORF2 to genes annotated in the human, worm, and yeast genomes. No significant sequence homology was found for 333 bp ORF1 and 360 bp ORF3.

Since transfection of segment T1 clearly rendered *L. major* resistant to terbinafine, this fragment was selected as a target for an insertional mutagenesis protocol. Inactivation of genes within T1 was carried out *in vitro* using the *mariner* transposition system [16]. Specific pairs of primers for each gene within T1 were used in a colony polymerase chain reaction (PCR) protocol in order to identify useful insertion events. Primers LT007 and LT008 were selected to screen insertion events into ORF2, revealing 5 out of 96 events that had the transposable element inserted within the 570 bp ORF. One of the insertions disrupting ORF2, named 82 (Fig. 1A), was transfected into *L. major*. The transfectant obtained, L82 (LT[pELHYG⁵⁰⁰T1::GFP*K82]), was used in a terbinafine resistance-assay where T1₅₀₀, H4, and LT252 were the positive and negative controls, respectively. The transfectant L82, in which the insertion occurred 141 bp downstream of ORF2 ATG, presented a fold resistance that was not different from the wild-type, indicating the loss of the terbinafine resistance-phenotype (Fig. 1C). Therefore, the integration of the *mariner* element/GFP*K at one fourth of the putative gene length was enough to inactivate the terbinafine resistance associated to the 2.8 kb fragment T1. ORF2 was thus named H region associated terbinafine resistance (*HTBF*).

The BLAST analysis of *HTBF* revealed that its predicted amino acid sequence had significant homology to the YIP1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. The predicted *HTBF* and the yeast protein shared 23.9% identity at the amino acid level and there was 38.4% identity between this *HTBF* and the *Caenorhabditis elegans* homologue. Overall, the *Leishmania* *HTBF* shared 27.0% identity with the domain consensus of YIP1 protein from different organisms (COG5080). In the yeast, YIP1 interacts with YPT, a protein related to vesicle docking and trafficking [17]. YPT is a Rab/GTPase

prenylated to a geranylgeranyl group that mediates attachment to membranes [18]. A pool of YPT exists in the cytosol, chaperoned by GDP dissociation inhibitor (GDI). Interaction with YIP1 promotes the dissociation of the YPT/GDI heterodimer, allowing YPT to reinsert into membranes [19]. A *YPT* homologue gene has already been identified in *L. major* and its product has been localized in the parasite Golgi apparatus [20].

The predicted *HTBF* is a 21 kDa protein containing four membrane-spanning domains, with both C and N terminus oriented toward the cytoplasmic face of the membrane. Kyte-Doolittle hydrophobicity plot analysis also indicated that *HTBF* is potentially an integral membrane protein. Southern blot analysis of pulse field gel electrophoresis (PFGE)-separated chromosomes, as well as *SacI* digested genomic DNA, suggested that *HTBF* is present in one copy in the chromosome 23 of *L. major* (data not shown).

The transcription of *HTBF* was studied using Northern blot analysis of total RNA extracted from *Leishmania* cell lines LT252 and SF-R30, as well as from transfectants T4₅₀₀, T1₃₂, T1₅₀₀, and L82. The 570 bp *HTBF* probe recognized predominantly a 1.9 kb transcript in T1₃₂, T1₅₀₀, and SF-R30, which was absent in LT252 line or transfectant T4₅₀₀ (Fig. 2A). Although the basal level of the transcript was not detected, its expression is evident in the H region-amplified cell line and in the transfectants carrying the intact recombinant *HTBF*. Increased drug pressure led to higher transcript levels in T1₅₀₀ when compared to T1₃₂. A 5 kb transcript, which could correspond to read-through transcription across the circular episome [15], was also detected in transfectants carrying pELHYG-T1, but not in the SF-R30 line. As a consequence of the insertion into *HTBF*, the transcripts detected in transfectant L82 were 2 kb larger than those found in T1₅₀₀. *HTBF* transcripts were also detected in T1₅₀₀ and SF-R30 through a RT-PCR method (Fig. 2B). Being a more sensitive method, the RT-PCR also detected the basal level of transcript in the LT252 line and transfectant T4₅₀₀. As expected, a 2 kb larger band was also amplified from L82 total RNA. Reactions that did not include the reverse transcriptase confirmed the absence of contaminating DNA in the template samples (data not shown).

HTBF could mediate resistance to terbinafine through a general mechanism involving the increased formation and/or the redirection of vesicles. Studies on the mechanism of metal resistance in *Leishmania* mediated by the ABC transporter PGPA suggested that this protein acts on metal-thiol conjugates [21]. PGPA is associated to intracellular membranes in structures proposed to be part of exocytic and endocytic pathways in *Leishmania* [22]. These findings indicated that PGPA confers resistance to arsenite and antimonials by sequestration of metals into vesicles that could be exocytosed through the flagellar pocket. In this scenario, *HTBF* would improve the process of vesicle trafficking and/or docking. It is noteworthy that *L. tarentolae* H region-derived amplicons containing *PGPA* are likely

Fig. 2. Analyses of *HTBF* transcripts. (A) Northern analysis of total RNA in the cell lines LT252 (lane 1); SF-R30 (lane 6) and transfectants T4₅₀₀ (lane 2); T1₃₂ (lane 3); T1₅₀₀ (lane 4) and L82 (lane 5); the black arrowhead indicates the ~3.9 kb transcript in the transfectant bearing the transposon insertion into *HTBF*. Total RNA from promastigote forms was extracted using TRIzol[®] reagent (Gibco BRL) and manipulated as described elsewhere [28]. The *HTBF* probe was amplified by PCR with primers LT007 (5'-GCGCCCGGGCATATGCTCAACGAGGTGC) and LT008 (5'-CGCGGATCCTAAATACCAACCAGA). (B) RT-PCR amplification products using *HTBF* primers (LT007/LT008) and total RNA from LT252 (lane 1); T4₅₀₀ (lane 2); T1₅₀₀ (lane 4); L82 (lane 5); and SF-R30 (lane 6); the white arrowhead indicates the amplification product of 2.5 kb which represents the insertion of element/GFP^{*}K into *HTBF*; reactions that did not include the reverse transcriptase confirmed the absence of contaminating DNA in the template samples (data not shown); reverse transcriptase-PCR was performed with Ready-To-Go[™] RT-PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's specifications.

to carry the *HTBF* gene [23], which is located only 2.2 kb upstream of *PGPA* in *L. major*.

The terbinafine interference on the ergosterol biosynthesis may result in the use of exceptional sterols and cause membrane malfunctioning. It has been suggested that Ca²⁺-dependent exocytosis may be essential in the maintenance of cell membrane integrity as it lowers surface tension [18,24]. In fact, proteolytic toxins, which specifically cleave soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors (SNARE), also block exocytosis and inhibit membrane resealing. A calcium-dependant ergosterol mutant of *S. cerevisiae* had already been described [25] and studies of a temperature-sensitive yeast mutant of YPT revealed that rescue from growth arrest could be achieved by increasing extracellular Ca²⁺ [26]. These observations clearly indicate that increased external levels of calcium ions can rescue either mutants of ergosterol biosynthesis or vesicle-docking pathways by triggering the membrane repairing machinery. Thus, terbinafine interference in *Leishmania* ergosterol biosynthesis would be supposedly counteracted by the activation of the membrane repairing machinery through the enhanced expression of *HTBF*.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, 98/09805–0; and UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; JFMM was sponsored by FAPESP, 99/03719–7.

References

- [1] WHO. Weekly epidemiological record. 2002;44:365–72.
- [2] Rangel H, Dagger F, Hernandez A, Liendo A, Urbina JA. Naturally azole-resistant *Leishmania braziliensis* promastigotes are rendered susceptible in the presence of terbinafine: comparative study with azole-susceptible *Leishmania mexicana* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2785–91.
- [3] Ellenberger TE, Beverley SM. Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. *J Biol Chem* 1989;264:15094–103.
- [4] Callahan HL, Roberts WL, Rainey PM, Beverley SM. The PGPA gene of *Leishmania major* mediates antimony (SbIII) resistance by decreasing influx and not by increasing efflux. *Mol Biochem Parasitol* 1994;68:145–9.
- [5] Legare D, Papadopoulou B, Roy G, Mukhopadhyay R, Haimeur A, Dey S, et al. Efflux systems and increased trypanothione levels in arsenite-resistant *Leishmania*. *Exp Parasitol* 1997;87:275–82.
- [6] Ouellette M, Fase-Fowler F, Borst P. The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. *EMBO J* 1990;9:1027–33.
- [7] Cunningham ML, Titus RG, Turco SJ, Beverley SM. Regulation of differentiation to the infective stage of the protozoan parasite *Leishmania major* by tetrahydrobiopterin. *Science* 2001;292:285–7.
- [8] Callahan HL, Beverley SM. A member of the aldoketo reductase family confers methotrexate resistance in *Leishmania*. *J Biol Chem* 1992;267:24165–8.
- [9] Papadopoulou B, Roy G, Ouellette M. A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of *Leishmania*. *EMBO J* 1992;11:3601–8.
- [10] Petranyi G, Ryder NS, Stutz A. Allylamine derivatives: new class of synthetic antifungal agents inhibiting fungal squalene epoxidase. *Science* 1984;224:1239–41.
- [11] Ryder NS. Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. *Br J Dermatol* 1992;126(Suppl 39):2–7.
- [12] Leyden J. Pharmacokinetics and pharmacology of terbinafine and itraconazole. *J Am Acad Dermatol* 1998;38:S42–7.
- [13] Callahan HL, Beverley SM. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. *J Biol Chem* 1991;266:18427–30.
- [14] Cotrim PC, Garrity LK, Beverley SM. Isolation of genes mediating resistance to inhibitors of nucleoside and ergosterol metabolism in *Leishmania* by overexpression/selection. *J Biol Chem* 1999;274:37723–30.
- [15] LeBowitz JH, Smith HQ, Rusche L, Beverley SM. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev* 1993;7:996–1007.

- [16] Tosi LRO, Beverley SM. *Cis* and *trans* factors affecting Mos1 mariner evolution and transposition in vitro, and its potential for functional genomics. *Nucleic Acids Res* 2000;28:784–90.
- [17] Yang X, Matern HT, Gallwitz D. Specific binding to a novel and essential Golgi membrane protein (Yip1p) functionally links the transport GTPases Ypt1p and Ypt31p. *EMBO J* 1998;17:4954–63.
- [18] Schimmoller F, Simon I, Pfeffer SR. Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J Biol Chem* 1998;273:22161–4.
- [19] Calero M, Whittaker GR, Collins RN. Yop1p, the yeast homolog of the polyposis locus protein 1, interacts with Yip1p and negatively regulates cell growth. *J Biol Chem* 2001;276:12100–12.
- [20] Cappai R, Osborn AH, Gleeson PA, Handman E. Cloning and characterization of a Golgi-associated GTP-binding protein homologue from *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 1993;62:73–82.
- [21] Grondin K, Haimeur A, Mukhopadhyay R, Rosen BP, Ouellette M. Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene *gsh1* and of the ABC transporter gene *pgpA* in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*. *EMBO J* 1997;16:3057–65.
- [22] Legare D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof YD, Rosen BP, Haimeur A, et al. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem* 2001;276:26301–7.
- [23] Grondin K, Roy G, Ouellette M. Formation of extrachromosomal circular amplicons with direct or inverted duplications in drug-resistant *Leishmania tarentolae*. *Mol Cell Biol* 1996;16:3587–95.
- [24] Togo T, Alderton JM, Steinhardt RA. Long-term potentiation of exocytosis and cell membrane repair in fibroblasts. *Mol Biol Cell* 2003;14:93–106.
- [25] Crowley JH, Tove S, Parks LW. A calcium-dependent ergosterol mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 1998;34:93–9.
- [26] Schmitt HD, Puzicha M, Gallwitz D. Study of a temperature-sensitive mutant of the ras-related YPT1 gene product in yeast suggests a role in the regulation of intracellular calcium. *Cell* 1988;53:635–47.
- [27] Clayton C, Adams M, Almeida R, Baltz T, Barrett M, Bastien P, et al. Genetic nomenclature for *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1998;97:221–4.
- [28] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Specificity of modified *Drosophila* mariner transposons in the identification of *Leishmania* genes

Marlei J. Augusto, Fabio M. Squina, Julio F.M. Marchini, Fabricio C. Dias,
Luiz R.O. Tosi*

Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo. Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirão Preto-SP, Brazil

Received 23 January 2004; received in revised form 2 July 2004; accepted 3 August 2004
Available online 2 October 2004

Abstract

Genetic manipulation of the protozoan *Leishmania* has led to a better understanding of the survival and development of these pathogens within their hosts. The association of the *Leishmania* genome sequencing information with the ability of transposons to introduce or destroy phenotypes allows a global perspective on the role and importance of genes in cellular pathways. Herein we report the construction and testing of mariner transposable elements carrying the neomycin phosphotransferase, green fluorescent protein, or β -glucuronidase genes as reporters for translational fusion events. We demonstrate that the expression of the reporter genes will occur only when the genes are inserted in-frame within predicted genes. Our results not only add to the mariner toolkit for gene manipulation but also strengthen the evidence that the mariner system is a reliable means for the study of gene expression in *Leishmania*.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Leishmania*; In vitro transposition; Mariner transposon; Gene trapping; H region

1. Introduction

Species of the protozoan *Leishmania* are the causative agents of a wide range of pathologies characterized by different degrees of severity and a range of symptoms collectively called leishmaniasis (Pearson and Sousa, 1996). The spectral quality of the disease most likely reflects a complex host–parasite interaction and poses a problem in its treatment (Olliari and Bryceson, 1993). Over the last decade our ability to genetically manipulate these trypanosomatids has greatly contributed to unravel the mechanisms that ensure the survival and development of these pathogens within their hosts (Beverley, 2003). Moreover, the completion of the *Leish-*

mania genome project promises to inspire a wide range of functional genomics initiatives (Beverley, 2003; Myler et al., 2001). These new strategies, which include the determination of transient transcriptomes and proteomes and the systematic generation of mutants, will undoubtedly further our knowledge of this parasite's biology and help in the design of effective vaccines and/or chemotherapy.

Transposable elements are effective tools for introducing new phenotypes as well as destroying endogenous loci within genomes. Transposon mutagenesis mediating gain or loss-of-function can be used for the determination of the role and importance of genes in cellular pathways (Ross-Macdonald et al., 1999). Transposon-based gene fusion libraries are a valuable proteomic tool not only for the study of the relationship between gene structure and function, but also for the determination of differential gene expression and protein

* Corresponding author. Fax: +55 16 633 1786.

E-mail address: luiztosi@fmrp.usp.br (L.R.O. Tosi).

localization (Kumar et al., 2002). The ability to report on protein levels is especially appealing in trypanosomatids where gene expression is regulated predominantly at the post-transcriptional level (Saxena et al., 2003). Tc1/mariner transposable elements were shown to be effective instruments for gene-delivery technologies. The *Drosophila* mariner Mos1 transposon is malleable and allows the design of specialised tools for gene trapping (Tosi and Beverley, 2000). Several Mos1 mariner derivatives have been constructed, including those that can yield protein fusion to selectable markers and/or conventional reporter genes (Goyard et al., 2001). The application of the mariner toolkit in shuttle mutagenesis protocols for this parasite was also described in the identification of the *HTBF* gene, which renders *Leishmania* resistant to terbinafine (Marchini et al., 2003). Herein we report the construction of two specialized mariner transposons to be used in trapping protocols and the testing of two other trapping elements designed to generate translational fusion between *Leishmania* genes and the neomycin phosphotransferase (NPT) or the green fluorescent protein (GFP). Our data demonstrates that expression of the reporter genes is specific and will only occur when inserted in-frame within predicted genes of the parasite.

2. Results and discussion

Transposons /NEO*ELSAT and /GFP*K are shown in Fig. 1 and their construction is described elsewhere (Goyard et al., 2001). The mobile element /NEO*EL-

SAT contains both the neomycin phosphotransferase (NPT) gene lacking its initiation ATG and a shuttle selectable marker, streptotrycin acetyl transferase (SAT). The element /GFP*K carries the green fluorescent protein (GFP) gene as a reporter and a kanamycin resistance marker that allows for selection of insertion events only in bacteria. The element /GUS*ELSAT bears the shuttle marker for neomycin resistance (SAT) and a trapping reporter gene, the β -glucuronidase (GUS) gene, in which the initiation ATG has been deleted. The use of GUS is advantageous, since the expression of fusion events in the parasite is screened rather than selected for. This is a useful feature when considering the detection of parasite transfectants carrying a compartmentalized fusion product.

The transposon /GFP*ELNEO carries the GFP reporter gene and its insertion events can also be recovered in the parasite. As in the shuttle vector pELNEO employed in its construction, this transposon contains the NEO cassette under control of a prokaryotic promoter. Therefore, /GFP*ELNEO insertion events mediate resistance to kanamycin in bacteria and can also select G418-resistant parasites.

The in vitro transposition efficiency of these transposons was comparable to that reported for other modified Mos1 elements (Tosi and Beverley, 2000). The use of the transposons described above is expected to generate a fusion product only when the insertion event places the reporter gene in-frame into the parasite target gene. These mariner-based transposons are useful for shuttle mutagenesis and their insertion into *Leishmania* genes can also generate reagents for gene disruption.

Fig. 1. Structure of the modified Mos1 transposons suitable for gene trapping, gene inactivation, and primer-island sequencing protocols. Reporter genes are represented by dashed arrows and are NEO, neomycin phosphotransferase gene; GFP, modified green fluorescent protein GFP⁺; GUS, β -glucuronidase gene. White arrows represent the selectable marker within each transposon, SAT, streptothricin acetyl transferase gene; and KAN, kanamycin resistance marker; 5' IR, mariner 5' inverted repeat; 3' IR, mariner 3' inverted repeat; AG, *Leishmania* trans-splicing acceptor site; (r), *Escherichia coli* promoter sequence. For the construction of /GUS*ELSAT, the ELSAT cassette was inserted into the *Bgl*II site of the pX63NEO-GUS (LeBowitz et al., 1991). The resulting construct *Nco*I/*Bgl*II digested and cloned, after Mung-bean nuclease treatment, into the *Msp*III site of pELHYΔ6-0 (Goyard et al., 2001). For the construction of /GFP*ELNEO, the NEO cassette was excised from pX63NEO (LeBowitz et al., 1991) with *Spe*I and ligated to the blunted pELHYG backbone after excision of the HYG gene by a *Bgl*II/*Sal*I digestion. An *Apa*I/*Bam*HI digestion of the resulting construct generated the 1.2 Kb ELNEO cassette that was cloned into the pELHYΔ6-/GFP*K (Goyard et al., 2001) digested with *Afl*III/*Bam*HI to eliminate the kanamycin resistance cassette. The construction of elements /NEO*ELSAT and /GFP*K is presented elsewhere (Goyard et al., 2001).

The targets for the transposition and testing of the mobile elements presented in Fig. 1 were subcloned fragments derived from the H region, a 48 kb locus that undergoes amplification when the parasite is subjected to pressure by many unrelated drugs (Ellenberger and Beverley, 1989). As shown in Fig. 2A, fragment T1 is 2.8 Kb-long and bears the terbinafine resistance gene *HTBF* (Marchini et al., 2003). Fragment H2 contains 12 Kb of the H locus (Tosi and Beverley, 2000) and codes for known genes, such as *PTR1* (pteridine reduc-

tase-1) and tryptophenyl t-RNA synthetase (*TTRS*). Three other genes of unknown function are annotated in this region (ORFs 1, 2, and 3; Fig. 2A). Both fragments were cloned into the shuttle vector pELHYG (Garraway et al., 1997) or its derivatives. Therefore, in vitro transposition into these molecules could be selected in bacteria and directly transfected into the parasite for the functional characterization of the insertion event.

Insertion sites were identified using primer-island sequencing of a library of insertions of /NEO*ELSAT

Fig. 2. Selection of transposition events into H locus subclones and fluorescent localization of fusion proteins in transfected *Leishmania* promastigotes. (A) Schematic representation of the H locus and the mapped insertions into the subcloned fragments T1 and H2. Dashed arrowheads represent the two sets of inverted repeats delimiting the H locus. Black arrows indicate genes annotated in the subcloned fragments; vertical lines represent mapped insertions irrespective of the direction of the transposon; (▼), selected insertion events in which the reporter gene is in the same direction of the annotated gene; (▲), selected insertions in the opposite direction; S, *SacI*; H, *HindIII*. The mariner in vitro transposition reaction was performed as described (Tosi and Beverley, 2000). Cloned products of transposition were used as templates for primer-island sequencing with primers LT001 (5'-CGACCAGGATGGGCACCA) and LT002 (5'-GAGAGTCATAGTTACTAA) for element /GFP*K; and LT004 (5'-GTCTCGAAACGTAAATG) for transposon /NEO*ELSAT. (B) Indirect immunofluorescence detection used an anti-NPTII antibody detected with an anti-rabbit fluoroisothiocyanate (FITC)-conjugated antibody and was performed as previously described (Jamur and Oliver, 1996); transfectants E12 (a); C02 (c) and G08 (e). Detection of GFP expression in transfectants B05 (g) and L82 (i). Positive and negative controls for the immunodetection protocols are NPT-expressing cell line (k) and LT252 wild type cells (m). Differential interference contrast image of each transfectant is shown in b, d, f, h, j, l, and n. *L. major*, LT252, CC1 clone (MHOM/IR/84/LT 252) was transfected as described elsewhere (Marchini et al., 2003). Stable transfectants were selected on 16 μg mL⁻¹ of hygromycin B or 8 μg mL⁻¹ of G418 and named according to Clayton et al. (Clayton et al., 1998).

into fragment H2. The distribution of the events across target DNA revealed little regional specificity ($P > 0.05$; χ^2 test). We identified five in-frame insertions among the 106 events sequenced. Analysis of the coding sequence across H2, which constitutes 71.6% of the total length of the fragment, revealed that only 21.8% of events in the correct orientation occur within the right frame. The bias observed is due to the fact that the transposons will generate a fusion product if inserted into a TA dinucleotide corresponding to the 2 and 3 base of a valine, leucine or isoleucine codon. The TA-containing codons are the least preferred by *Leishmania* when coding for these aminoacids (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). Therefore, the estimate percentage of in-frame insertions of /GFP*K and /NEO*ELSAT into fragment H2 is 7.3%. The number of events identified (4.7% of the total) is not significantly different from the expected percentage ($P > 0.05$, χ^2 test).

Fig. 2A shows the events used for transfection into the parasite. In clone E12 the reporter NPT gene is in-frame with predicted gene ORF 3. Clone C02 carries an out-of-frame insertion into the *TTRS* gene and clone G08 represents an insertion between *TTRS* and ORF 3, in the same orientation as the annotated H2 genes (Fig. 2A).

Transposition into fragment T1 was carried out in vitro using the /GFP*K element. A specific pair of primers was used in a colony polymerase chain reaction (PCR) protocol in order to identify useful events into the *HTBF* gene. Five out of 96 of them yielded a PCR product of 2.5 kb, indicating that the element /GFP*K had inserted within the 570-bps gene. Clone 82 is an out-of-frame insertion of /GFP*K into *HTBF* and was used previously to functionally link this gene to a terbinafine resistance phenotype (Marchini et al., 2003). Clone B05 carries an in-frame insertion of reporter GFP after the first one-fourth of the *HTBF* gene (Fig. 2A).

The selected insertions mentioned above were transfected into *L. major*. Parasite transfectants E12 (LT[pELHYG¹⁶H2::/NEO*ELSATe12]), C02 (LT[pELHYG¹⁶H2::/NEO*ELSATc02]), G08 (LT[pELHYG¹⁶H2::/NEO*ELSATG08]), L82 (LT[pELHYG³²T1::/GFP*K82]) and B05 (LT[pELHYG³²T1::/GFP*Kb05]) were isolated and kept under 16 or 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of hygromycin B. The wild-type LT252 cell line and transfectant H2 (LT[pELHYG¹⁶H2]) carrying the target DNA pELHYGH2 were used as negative controls in immunofluorescence microscopy protocols. Transfectant E12, which bears the reporter NPT gene in-frame with predicted ORF 3, was able to grow in the presence of 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of G418. The expression of the reporter gene was not observed in those transfectants carrying out-of-frame or intergenic insertions (transfectants C02 and G08). The use of a selection-based protocol facilitates the identification and isolation of parasite cell lines carrying trapped genes. Such strategy has the potential drawback of not

being able to select mutants in which a fusion product is compartmentalized. In fact, after transfection of a H2::/NEO*ELSAT insertion library, only 3% of the transfectants selected in hygromycin B survived when transferred to medium containing 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of G418. Screening for NPT activity (Amoroso and Gutkind, 1998) instead of selection for resistance we may circumvent this problem.

The detection of fusion products generated by the insertion of the /NEO*ELSAT transposon was based on an immunolocalization protocol using an anti-NPT antibody. Fig. 2B shows the results obtained for transfectants E12, C02, and G08. The expression of the NPT gene was detected in transfectant E12 exclusively, confirming the phenotype of these cell lines in G418-containing media. The immunodetection experiment did not reveal the precise location of the fusion product within transfectant E12. However, the fact that the anti-NPT antibody did not detect a fusion protein in the transfectants C02 and G08 (Fig. 2B) confirms the specificity of this mariner-based trapping transposon. These results suggest that the /NEO*ELSAT element is suitable for use in gene identification and characterization protocols.

The detection of a GFP fusion product in cell lines carrying the /GFP*K transposon was done by direct observation of fixed cells under fluorescence microscopy or confocal analysis of live cells. The transfectants used in these experiments were B05 and L82, which correspond to in-frame and out-of-frame insertions into the *HTBF* gene, respectively. As shown in Fig. 2B, the GFP fusion product seems to be dispersed in the cytoplasm of the transfectant B05 cells exclusively. The predicted HTBF is an integral protein with four membrane-spanning domains and the integration of /GFP*K at one-fourth of the gene eliminates such structures and displaces the fusion product.

Our data suggests that the mariner in vitro transposition system could be used as a reliable reporter of gene expression in *Leishmania*. This transposon-based gene-trapping strategy is an inexpensive source of reagents for functional investigation of the vast amount of information generated by the genome sequencing initiative. The system tests the expression aptitude of putative genes present in a specific locus, and also generates reagents for their functional characterization. Insertion events may be the source of fragments adequate for genome integration by homologous recombination, which may allow either the characterization of the fusion protein expressed from a chromosomal context or the study of the effect of the disruption of a particular gene.

Acknowledgments

We thank Stephen M. Beverley and Angela K. Cruz for fruitful discussions. We are grateful to Constance

Oliver and Maria C. Jamur for suggestions and help in the immunofluorescence experiments. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, 98/09805-0; and UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; M.J.A., F.M.S., J.F.M.M., and F.C.D. were sponsored by FAPESP (00/09511-8; 01/02527-9; 99/03719-7; and 02/06375-1).

References

- Amoroso, A.M., Gutkind, G.O., 1998. Chromogenic detection of aminoglycoside phosphotransferases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 228–230.
- Beverley, S.M., 2003. Protozoomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age. *Nat. Rev. Genet.* 4, 11–19.
- Clayton, C., Adams, M., Almeida, R., Baltz, T., Barrett, M., Bastien, P., Belli, S., Beverley, S., Biteau, N., Blackwell, J., Blaineau, C., Boshart, M., Bringaud, F., Cross, G., Cruz, A., Degrave, W., Donelson, J., El-Sayed, N., Fu, G., Ersfeld, K., Gibson, W., Gull, K., Ivens, A., Kelly, J., Vanhamme, L., et al., 1998. Genetic nomenclature for *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 97, 221–224.
- Ellenberger, T.E., Beverley, S.M., 1989. Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania* major. *J. Biol. Chem.* 264, 15094–15103.
- Garraway, L.A., Tosi, L.R., Wang, Y., Moore, J.B., Dobson, D.E., Beverley, S.M., 1997. Insertional mutagenesis by a modified in vitro Ty1 transposition system. *Gene* 198, 27–35.
- Goyard, S., Tosi, L.R.O., Gouzova, J., Majors, J., Beverley, S.M., 2001. New Mos1 mariner transposons suitable for the recovery of gene fusions in vivo and in vitro. *Gene* 280, 97–105.
- Jamur, M.C., Oliver, C., 1996. Binding of antibody to the gamma subunit of FCepsilonRI in rat basophilic leukemia cells results in morphological changes without inducing histamine release. *Cell Tissue Res.* 284, 153–159.
- Kumar, A., Agarwal, S., Heyman, J.A., Matson, S., Heidtman, M., Piccirillo, S., Umansky, L., Drawid, A., Jansen, R., Liu, Y., Cheung, K.H., Miller, P., Gerstein, M., Roeder, G.S., Snyder, M., 2002. Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev.* 16, 707–719.
- LeBowitz, J.H., Coburn, C.M., Beverley, S.M., 1991. Simultaneous transient expression assays of the trypanosomatid parasite *Leishmania* using beta-galactosidase and beta-glucuronidase as reporter enzymes. *Gene* 103, 119–123.
- Marchini, J.F., Cruz, A.K., Beverley, S.M., Tosi, L.R., 2003. The H region HTBF gene mediates terbinafine resistance in *Leishmania* major. *Mol. Biochem. Parasitol.* 131, 77–81.
- Myler, P.J., Beverley, S.M., Cruz, A.K., Dobson, D.E., Ivens, A.C., McDonagh, P.D., Madhubala, R., Martinez-Calvillo, S., Ruiz, J.C., Saxena, A., Sisk, E., Sunkin, S.M., Worthey, E., Yan, S., Stuart, K.D., 2001. The *Leishmania* genome project: new insights into gene organization and function. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* 190, 9–12.
- Olliaro, P., Bryceson, A., 1993. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitol. Today* 9, 323–328.
- Pearson, R.D., Sousa, A.Q., 1996. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* 22, 1–13.
- Ross-Macdonald, P., Coelho, P.S., Roemer, T., Agarwal, S., Kumar, A., Jansen, R., Cheung, K.H., Sheehan, A., Symoniat, D., Umansky, L., Heidtman, M., Nelson, F.K., Iwasaki, H., Hager, K., Gerstein, M., Miller, P., Roeder, G.S., Snyder, M., 1999. Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption. *Nature* 402, 413–418.
- Saxena, A., Worthey, E.A., Yan, S., Leland, A., Stuart, K.D., Myler, P.J., 2003. Evaluation of differential gene expression in *Leishmania* major Friedlin procyclics and metacyclics using DNA microarray analysis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 129, 103–114.
- Tosi, L.R.O., Beverley, S.M., 2000. *Cis* and *trans* factors affecting Mos1 mariner evolution and transposition in vitro, and its potential for functional genomics. *Nucleic Acids Res.* 28, 784–790.

1 As interações da proteína Yip1p em *S. cerevisiae* e seu papel no
2 transporte vesicular

3

4 Julio FM Marchini, Luiz RO Tosi

5

6 Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos.

7 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

8

9 O modelo da célula como base da vida teve vantagem competitiva na
10 seleção natural ao separar substâncias como o ácido desoxirribonucléico e
11 proteínas em compartimentos com concentração de íons e pH controlados,
12 oferecendo proteção de alterações súbitas do ambiente em que estão
13 presentes. É necessário um sistema baseado em compartimentos permitindo
14 a constante troca de substâncias de um compartimento para o outro e com o
15 meio externo de maneira controlada. Desta forma não altera o microambiente
16 e as características de cada compartimento. O desenvolvimento de
17 compartimentos especializados desenvolveu-se concomitantemente ao
18 sistema de tráfego vesicular o que explica sua conservação em diferentes
19 espécies (Rothman 1994; Sudhof 1995; Calakos e Scheller 1996).

20 O tráfego vesicular pode ser classificado entre quais membranas ele
21 ocorre, ou dividido nas fases de brotamento vesicular, cisão, transporte da
22 vesícula, atracamento e fusão vesicular. O brotamento vesicular ocorre
23 através da ativação de capas proteicas de diferentes tipos: clatrina, COPI e
24 COPII. Cada uma destas possuindo especificidade para determinadas vias
25 intracelulares. A ativação ocorre através de proteínas Rab/Ras como a Sar1

1 que desencadeiam o recrutamento da cascata de transporte que envolve
2 proteínas selecionadoras de conteúdo vesicular (receptoras de carga) e
3 transmembranais, proteínas da capa, e proteínas definidoras do alvo vesicular.
4 As proteínas que serão transportadas possuem domínios localizatórios que
5 interagem com as proteínas selecionadoras determinando dessa forma a
6 especificidade do que será transportado. A capa protéica ao ser montada
7 deforma a membrana, evaginando-a. Ao mesmo tempo, forma uma porção
8 da membrana especializada, rica em proteínas tanto necessárias ao
9 transporte quanto com sinal de transporte mas pobre em proteínas que
10 devem permanecer na membrana doadora. O último conjunto de proteínas
11 está envolvido no direcionamento da vesícula e na regulação do tráfego. Será
12 focado nesta explanação o transporte vesicular relacionado a vesículas em
13 que a proteína Yip1 participa; vesículas dependentes de COPII e GTPases
14 do tipo Rab do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi.

15 As capas das vesículas COPII consistem-se em três complexos:
16 Sec23/24, Sec13/31 e Sar1 (Matsuoka, Orci et al. 1998). *In vivo* a Sar1 é
17 ativada pela Sec12 que é uma *guanosine exchange factor* (GEF). Por sua
18 vez a Sar1 catalisa a incorporação seqüencial dos outros dois componentes
19 que ativamente promovem a deformação da membrana levando a seu
20 brotamento.

21

22 Ciclo da Rab

23

24 As primeiras proteínas Rab identificadas foram as proteínas Sec4 e
25 Ypt1 (Gallwitz, Donath et al. 1983). Em levedura outras oito estão presentes,

1 sendo que uma tem duas isoformas (Ypt31 e Ypt32) e outra tem três
2 isoformas (Ypt51, Ypt52 e Ypt53). Essas proteínas foram funcionalmente
3 associadas a vias de tráfego intracelular (Lazar, Gotte et al. 1997; Buvelot
4 Frei, Rahl et al. 2006). Do transporte de retículo para Golgi participa a Ypt1.
5 O transporte intra-golgi e trans-golgi é regulado pela Ypt31 e Ypt32. Sendo
6 que a Ypt31 estaria envolvida no sentido exocítico e a Ypt32 do golgi para
7 endossomo. A Sec4 participa no passo seguinte, do golgi para a membrana
8 plasmática. No percurso de retorno da membrana plasmática para o
9 endossomo há envolvimento seqüencial de Ypt51 (também conhecida com
10 Vps21), Ypt52 e Ypt53. Vesículas que reciclam o endossomo envolvem a
11 Ypt6 e finalmente do endossomo para o vacúolo e inter-vacuolar participa a
12 Ypt7. Foram descritas ainda mais duas Ypt, Ypt10 e Ypt11. A deleção dessas
13 proteínas não produziu alteração de fenótipo. Já a superexpressão de Ypt10
14 tem efeitos inibitórios no crescimento. Esta proteína é localizada por fusão
15 com GFP na via endossomal. A Ypt11 foi definida como participante do
16 processo de herança de retículo endoplasmático para cada célula-filha
17 durante a divisão celular.

18 O modelo atual (Novick e Zerial 1997) de funcionamento das proteínas
19 Rab envolve um ciclo entre a membrana doadora e receptora e a volta pelo
20 citosol. A *Rab escort protein* (REP), uma proteína *chaperone* participa da
21 síntese da Rab conjuntamente à geranilgeranil transferase II promovendo
22 uma transformação pós-traducional (Desnoyers e Seabra 1998; Seabra
23 1998). São adicionados dois grupos geranilgeranil a dupla de cisteínas em
24 sua extremidade C-terminal. Em sua forma citosólica e inativa, a proteína
25 Rab-GDP fica ligada a uma segunda proteína *chaperone*, ao inibidor de

1 dissociação de GDP (GDI) que participa do ciclo da Rab permitindo a
2 migração da Rab pelo citosol de volta a membrana doadora. Neste local, um
3 fator de dissociação de GDI (GDF) promove a separação da Rab do GDI e a
4 inserção dos grupos geranylgeranil na membrana. Concomitante, a Rab sofre
5 a troca de GDP por GTP por um GEF tornando-se ativa. O brotamento
6 vesicular ocorre, através da maquinaria COPII e a vesícula é transportada até
7 seu alvo. A Rab participa então do atracamento, sendo ativada por uma
8 proteína ativadora de GTPase (GAP), servindo como plataforma para a
9 formação do complexo SNARE através da hidrólise de seu GTP. O ciclo se
10 reinicia pois a Rab em sua forma inativa volta a ter afinidade pela GDI sendo
11 resgatada da membrana.

12 Foi demonstrado (Calero, Chen et al. 2003) que modificações na Ypt1,
13 alterando os resíduos cisteína ou excluindo um ou dois dos resíduos, foram
14 letais quando presentes como única cópia funcionante em levedura (através
15 de plasmídeos Ura3 em meio 5-FOA). A ausência de modificação pós-
16 traducional foi confirmada encontrando-se o mutante Δ CC apenas em fração
17 citosólica. A interação da Yip1 com Ypt1 monopreniladas ou sem prenilação
18 foi prejudicada. A dupla prenilação é necessária para interação com Yip1 e
19 essencial para o organismo.

20

21 Fusão Vesicular

22

23 A fusão vesicular se inicia com a interação v-SNARE/t-SNARE. As
24 proteínas v-SNARE presentes nas vesículas provenientes do retículo são
25 Bos1p, Sec22p e Bet1p. A proteína t-SNARE presente no Golgi é a Sed5p

1 (Grabowski e Gallwitz 1997). Inicialmente reconheceu-se (Lian, Stone et al.
2 1994) a importância da Ypt1 na interação de proteínas SNARE, quando em
3 mutantes *ypt1ts* ocorreu uma diminuição da interação das SNARE Sec22p e
4 Bos1p (o mutante *ypt1ts* sintetiza quantidades normais de Sec22p). A
5 superexpressão de ambas as proteínas recuperou o fenótipo, mas não cada
6 uma isoladamente. Ainda participam nesta interação a proteína Sly1p. Apesar
7 da proteína Sly1p ser necessária (Lupashin, Hamamoto et al. 1996), pode
8 funcionar como um inibidor (Pevsner, Hsu et al. 1994).

9 Foi demonstrado (Lupashin e Waters 1997) que a proteína Ypt1p
10 interage *in vivo* diretamente com a t-SNARE Sed5p (Figura 1), apesar de
11 maneira fraca, o que sugere uma interação de baixa afinidade ou transiente.
12 A interação foi confirmada por precipitação em *beads* de glutationa-
13 sepharose.

14 O complexo SNARE uma vez formado ativa os passos finais da fusão
15 e é desfeito pela SNAP associado a NSF. Em *S. cerevisiae* essas proteínas
16 correspondem a Sec18p e Sec17p respectivamente. Na Figura 2, na
17 imunoprecipitação no mutante *sec18* com a t-SNARE Sed5p detecta-se a
18 presença das proteínas v-SNARE Sec22p e Bet1p confirmando que o
19 complexo SNARE não se desfez. No duplo mutante sem plasmídeos não
20 ocorre coprecipitação, o que é interpretado como a interação do complexo
21 SNARE nunca ter acontecido. No mutante com um plasmídeo de baixa cópia,
22 CEN (baseado em centrômero) contendo o *ypt*, a interação volta a ocorrer.
23 No mutante com o plasmídeo de alta cópia, a interação diminuiu. Ypt1p é
24 necessário para a interação do complexo SNARE mas o seu excesso
25 interfere na interação. A mutante *sly1-20* da proteína Sly1p também é capaz

1 de recuperar a formação do complexo SNARE sem necessidade da Ypt1p
2 (de onde o nome: *Supressor of Loss of Ypt1p*).

3 Na Figura 3 observamos que ambos o Sly1p e Sec22p coprecipitam
4 com Sed5p. No entanto, não ocorre interação mútua entre os dois fatores.
5 Isto sugere que Sed5p está presente em um de dois complexos:
6 Sec22p/Sed5p ou Sly1p/Sed5p e não em um complexo trímero. A
7 concentração de Ypt também diminui a interação Sed5p/Sly1p. Finalmente
8 em um mutante *sec18*, o Sed5p não coprecipitou o Sly1p. Conclui-se que a
9 proteína Sly1p interage com a t-SNARE Sed5p capacitando à iniciar a fusão
10 mas permanece ligada. A proteína Ypt1p deslocaria a proteína Sly1p, e como
11 sua afinidade é menor, a interação é transitória, e permitiria a interação do
12 Sed5p com a Sec22p. Esse modelo explicaria a interação negativa que
13 ocorre com o excesso de Ypt1p, já que por efeito de massa aumentaria sua
14 afinidade pelo Sed5p.

15 Uma menor afinidade da Sly1-20p pela proteína Sed5p poderia
16 explicar a recuperação do fenótipo. Mas esta hipótese foi provada estar
17 errada (Lupashin e Waters 1997). Uma hipótese que poderia ser aventada é
18 que a própria proteína Sec22p teria interação com o mutante *sly1-20*
19 conseguindo deslocá-lo permitindo a formação do complexo SNARE.

20

21 Complexo trímero YIP1/YIF1/YOS1

22

23 A Yip1 foi identificada (Yang, Matern et al. 1998) como uma proteína
24 que interage com as Rab's Ypt1p e Ypt31p, pelo método de dois híbridos em
25 levedura. Essa interação foi repetida através de fusão com GST da proteína

1 Yip1p completa e outra com a porção N-terminal da proteína. A Yip1p
2 completa precipitou ambas as proteínas Rab em uma coluna de glutathione-
3 sepharose 4B enquanto que o fragmento da proteína precipitou de maneira
4 semelhante a Ypt31p e em menor quantidade a Ypt1p.

5 A Yip1p é uma proteína com uma porção N-terminal hidrofílica e
6 porção C-terminal contendo domínios alfa-hélice. A fusão do Yip1p com uma
7 cauda de histidina, foi incubada em 5M Uréia, 1% Triton X-100, alta
8 concentração salina ou pH alcalino e centrifugada a 100.000g. Foi confirmada
9 como proteína transmembranal integral pois foi detectada no sobrenadante
10 apenas após a adição do detergente. A sua localização intracelular foi
11 testada através de fracionamento celular com *glass beads* e centrifugação a
12 10.000g ou 100.000g, ou ainda em um gradiente de sacarose. A expressão
13 regular da Yip1p precipitou nas mesma frações do gradiente de sacarose que
14 a proteína Kex2p (marcador de Golgi). A expressão em uma linhagem com
15 plasmídeo de alta cópia, mostrou a presença de Yip1p também no retículo
16 endoplasmático (na fração de 10.000g)

17 Utilizando-se a Yip1p como isca em experimentos de dois híbridos em
18 levedura (Matern, Yang et al. 2000), identificou-se uma forma incompleta da
19 proteína YNL263c, faltando 55 amino ácidos da extremidade N-terminal. Esta
20 proteína foi denominada *Yip1p interacting factor* (Yif1p). Experimento
21 adicionais de dois híbridos mostraram a interação da Yip1p com a deleção de
22 até 99 amino ácidos da extremidade N-terminal da Yif1p. No entanto quando
23 foi testada a interação com as proteínas Rab Ypt1p e Ypt31p, apenas a forma
24 completa da Yif1p demonstrou interação. Não ocorreu interação da Yif1p com
25 outras proteínas Rab (Ypt6p, Ypt7p, Ypt10p e Sec4p). A interação

1 Yip1p/Yif1p foi confirmada pela co-precipitação com anticorpos e
2 identificados em *western blot*.

3 A Yif1p é conservada evolutivamente em diferente espécies, possui
4 em sua seqüência cinco domínios supostamente transmembranais em sua
5 extremidade C-terminal e da mesma forma que a Yip1p foi detectada no
6 sobrenadante apenas na fração com detergente. Células de levedura foram
7 permeabilizadas e tratadas com proteinase K com ou sem a presença de
8 detergente. A ligação de um anticorpo contra a porção N-terminal da Yif1p
9 não detectou o seu alvo ao contrário da proteína Emp47p (que possui um N-
10 terminal luminal) que mostra que a Yif1p tem um N-terminal citosólico. Em
11 gradientes da sacarose a Yif1p precipita juntamente a Yip1p.

12 Mais recentemente uma terceira proteína foi identificada (Heidtman,
13 Chen et al. 2005) como fazendo parte do complexo Yip1p/Yif1p. O mutante
14 *yip1-4* (E70K) foi utilizada em um screening com a biblioteca genômica
15 YEp24 para se detectar um plasmídeo que recuperasse seu fenótipo de
16 termossensibilidade. Além do próprio Yip1p, foi detectado também a proteína
17 YER074W-A, denominada *Yip One Suppressor 1* (Yos1p). O gene Yos1
18 contém dois introns e prevê codificação de uma proteína de 87 amino ácidos
19 com dois domínios transmembranais um em cada extremidade. Isto foi
20 confirmado detectando-se a proteína Yos1p na presença de detergente no
21 sobrenadante e no precipitado em outras condições. Yos1p é uma proteína
22 conservada em diferentes espécies. Através da mutagênese de uma cópia do
23 gene Yos1 com um marcador His5+, identificou-se em análise de tétrades
24 que Yos1 é essencial. Não foi encontrado em nenhum dos esporos

1 sobreviventes o marcador His5+. Um plasmídeo contendo o Yos1 recupera
2 sobreviventes com o marcador His5+.

3 A presença de Yip1p/Yif1p no complexo de Golgi, retículo
4 endoplasmático e vesículas COPII foi demonstrada. Um mutante
5 termossensível *sec12* (bloqueia retículo para golgi, mas não bloqueia o
6 transporte retrógrado de golgi para retículo) leva ao acúmulo de Yip1p/Yif1p
7 no retículo. A Yos1p foi precipitada em gradiente de sacarose e co-localizou
8 com a Och1p (presente no Golgi) e Sec61p (presente no retículo) da mesma
9 maneira que a Yip1p.

10 Uma linhagem contendo o Yif1p em fusão com hemaglutinina (HA)
11 como única cópia do Yif1p foi imunoprecipitada com anticorpo anti-HA.
12 Ocorreu a co-precipitação tanto do Yip1p quanto do Yos1p (Figura 4). Da
13 mesma maneira a imunoprecipitação com anticorpo anti-Yos1p levou a co-
14 precipitação do Yif1p-HA e Yip1p. Quando a mesma interação foi testado na
15 linhagem *yip1-4*, não houve co-precipitação do Yip1-4(E70K) com anticorpo
16 anti-Yos1p.

17 Experimentos funcionais foram utilizados para se detectar o transporte
18 do retículo para o complexo de golgi. Precusores de uma proteinase
19 vacuolar, a carboxipeptidase Y, presentes no retículo endoplasmático e no
20 Golgi, podem ser distinguidos com um pulso curto de amino acido radioativo.
21 CPY primeiro aparece no RE em uma forma precursora (P1) com 67kDa, é
22 modificado no Golgi para 69kDa (P2). Finalmente é processado no vacúolo
23 para forma madura (M) de 61kDa. A fosfatase alcalina tem uma forma
24 precursora (pALP) com mais massa que a sua forma madura (mALP) (Benli,
25 Doring et al. 1996).

1 O experimento foi realizado incubando-se uma concentração
2 conhecida de células com ^{35}S -metionina e ^{35}S -cisteína por 15 minutos. A
3 seguir, os marcadores radioativos eram lavados e metionina e cisteína não
4 marcadas eram adicionadas e deixadas de acordo com o tempo de cada
5 experimento (*chase time*). As células foram lisadas com *glass beads*,
6 imunoprecipitadas com proteína A-Sepharose. As amostras eram então
7 separadas usando SDS-PAGE. As proteínas no gel eram coradas com
8 *coomassie blue* e finalmente expostas revelando sinal radioativo.

9 Observamos na Figura 5 o ensaio com a carboxipeptidase Y de
10 mutantes de todos os componentes da complexo trímero. Na forma selvagem
11 com 30 minutos de *chase time*, temos a presença da forma vacuolar da
12 proteína. Observamos em todos os mutantes, de forma termossensível a
13 ausência da forma madura mesmo após 30 minutos (e da forma madura da
14 fosfatase alcalina no ensaio realizado com yif).

15 As linhagens com superexpressão do Yip1p também apresentam
16 bloqueio do transporte do retículo para Golgi demonstrado através da
17 permanência da forma imatura da carboxipeptidase Y.

18 Um segundo ensaio consiste na observação da forma expressa da
19 proteína invertase. Após indução de seu promotor uma amostra de células é
20 colocada na temperatura a ser estudada (25° ou 37°) por 30 minutos, mantido
21 nesta temperatura com a adição de cisteína e metionina marcada por 30
22 minutos e 20 minutos sem marcação (*chase time*). No Golgi ocorre a
23 glicosilação da invertase. É feita a separação do conteúdo interno de
24 invertase do conteúdo periplásmico (entre membrana e parede celular).

1 Com o ensaio da invertase, visto na Figura 6, observamos na linhagem
2 selvagem, a presença da enzima apenas no extracelular em sua forma mais
3 pesada (glicosilada). No controle negativo, o mutante *sec18* termossensível,
4 observamos na temperatura restritiva o não processamento da invertase,
5 visto que está presente apenas na fração intracelular e em sua forma não
6 glicosilada. Nas linhagens mutantes de Yif1 e Yip1, temos quadros
7 intermediários, mostrando um prejuízo do transporte do retículo para Golgi.

8 Um modelo *in vitro* do transporte de retículo para Golgi foi
9 desenvolvido (Ruohola, Kabcenell et al. 1988; Lian e Ferro-Novick 1993;
10 Barrowman, Sacher et al. 2000). Uma forma precursora (prepró- α -fator) do
11 ferormônio α -fator é utilizado como marcador. Esta forma inicial possui 19kD.
12 Recebe então três cadeias oligossacarídicas ligadas a N no retículo
13 endoplasmático (26kD). No Golgi continua sendo processado, primeiramente
14 no cis-Golgi onde pode ser detectada uma forma de 28kD. Após passagem
15 completa pelo Golgi recebe uma cadeia externa de múltiplas α 1,6-manoses,
16 que tem alto peso molecular.

17 Utiliza-se *spheroplasts* que são “fantasmas” das células. São obtidas
18 pela incubação com meio de alta osmolaridade, o meio *spheroplasting* (YP,
19 glicose, KPO₄, Sorbitol, β -mercaptoetanol e Zymolase), colocados em um
20 meio de regeneração (YP, glicose e sorbitol), e então colocados em um
21 tampão de permeabilização (Acetato de K, Sorbitol, MgCl, Hepes). Desta
22 forma seu conteúdo citoplasmático, é eliminado com a permanência de
23 núcleo. Hexokinase B (que é citoplasmática) foi detectada no sobrenadante
24 enquanto a carboxipeptidase Y (que é vacuolar) não foi detectada. O

1 sobrenadante pode ser coletado e posteriormente dividido em frações que
2 podem ser reintroduzidas ao experimento seletivamente.

3 Adicionou-se às células permeabilizadas a forma precursora de 19kD.
4 50-70% foi convertido na forma RE (26kD), conjuntamente à diminuição
5 correspondente da forma 19kD. Isto indica que o RE está biologicamente
6 ativo. A presença de tripsina no meio não alterou resultados mostrando que a
7 reação ocorre em compartimentos membranais selados.

8 As células foram centrifugadas e ressuspensas em um meio com a
9 fração que contém as membranas receptoras. Após incubação em 90
10 minutos a 20°, uma forma de alta peso molecular foi constatada. O controle
11 do experimento foi realizado a 0°, ou na presença de apirase (que depleta
12 ATP) onde não observou-se a conversão para a forma de alto peso
13 molecular.

14 No mutante *sec18* não se constata a adição de cadeia de manose no
15 α -fator. O Sec18p, é uma das proteínas que desencadeiam o processo de
16 fusão propriamente dito. Interage com o complexo SNARE desfazendo-o, e
17 ativa a fase trans-SNARE. A não-detecção da forma de alto peso molecular
18 neste mutante é mais uma evidência para a correspondência desse modelo
19 de transporte *in vitro* com o *in vivo*.

20 Gradiente de sacarose é utilizado para separar vesículas derivadas de
21 RE de membranas de Golgi. Cada fração é então precipitada usando
22 sepharose-concanavalina-A. O brotamento vesicular foi medido através do
23 detecção do fator de 26kD. O consumo de vesículas foi visto precipitando-se
24 com anticorpo anti cadeia externa (manose) que reconhece a forma de alto
25 peso molecular mas não a forma de 26kD.

1 Usando este ensaio, observa-se que o tipo selvagem é capaz de
2 brotamento com uma eficiência de 30%, o mutante *yip1-4* 12% e a presença
3 do plasmídeo Yos1 no mutante *yip1-4* eleva a capacidade de brotamento
4 para 23%. Quando o próprio mutante *yos1-1* foi comparado, na temperatura
5 permissiva, houve uma redução de 30% de transporte para o complexo de
6 Golgi.

7 Uma outra possibilidade com os microsossomos gerados *in vitro* é a
8 detecção das proteínas que são empacotadas em vesículas. A incubação na
9 presença ou ausência de proteínas COPII determina a especificidade do
10 empacotamento em cada tipo de vesícula. Yos1p e Yip1p são eficientemente
11 empacotados em vesículas na presença de proteínas COPII (Figura 7).

12

13 Fator regulador, Yop1

14

15 Em outra tentativa (Calero, Whittaker et al. 2001) de identificar uma
16 proteína com interação ao Yip1p, um experimento com dois híbridos em
17 levedura foi realizado utilizando uma biblioteca de fragmentos 0,5 a 1kb
18 (James, Halladay et al. 1996). Identificou-se a ORF YPR028W por meio de
19 apenas de 17 amino ácidos de sua extremidade N-terminal. Foi denominado
20 *Yip One Partner* (Yop1), que em alguns trabalhos foi denominada Yip2p. A
21 interação confirmou-se invertendo-se a isca com a presa. A seqüência
22 primária prediz ter dois domínios transmembranais com N-terminal citosólico.
23 Yop1p foi confirmada como proteína de membrana integral separando-se no
24 sobrenadante apenas com a adição de 1% Triton X-100. A fusão GST-Yop1p
25 foi ligada a uma coluna de sepharose-glutationa e a proteína Yip1p co-

1 precipitou com a Yop1p mas não com GST sozinho. Ypt7p não se ligou a
2 Yop1p. Yop1p está precipita nas frações 10.000g e 100.000g (membranas
3 leves e pesadas respectivamente).

4 Haplóides $\Delta Yop1$ são viáveis, indicando que são dispensáveis para
5 crescimento vegetativo. A seguir foi examinado a superexpressão tanto da
6 forma completa quanto de uma forma com a ausência de 17 amino ácidos do
7 N-terminal. Ambos as construções resultaram em fenótipo dominante letal. A
8 expressão da forma completa levou a células de forma aberrante e
9 aumentadas ($5,5 \pm 0,9 \mu M$ contra $6,85 \pm 0,97 \mu M$). Já a expressão da forma
10 incompleta levou a células menores ($3,3 \pm 0,37$). A superexpressão conjunta
11 do Yip1 recupera a função da Yop1 completa, mas não a forma incompleta.
12 Este experimento está na Figura 8.

13 Foram testadas adicionalmente outras interações através de
14 coprecipitação em glutathiona-sepharose com Yop1p-GST. Não houve
15 interação dela com a Ypt1p sem suas cisteínas terminais. Houve interação
16 com as proteínas Ypt52p, Sec4p, Ypt6p e Ypt7p. Para se determinar quais
17 destas interações tem importância *in vivo* foram transfectados plasmídeos de
18 alta cópia na linhagem que superexpressa a Yop1 completa. Nenhuma das
19 outras proteínas foi capaz de recuperar o fenótipo com exceção da Ypt6p que
20 foi capaz de recuperar o fenótipo do gene Yop1 incompleta como pode ser
21 visto na Figura 9. Reforçando esta interação, houve colocação da Yop1p
22 com a Ypt6p.

23 Identificou-se desta forma dois domínios funcionais na Yop1p. A
24 interação da Yip1p com Yop1p que ocorre através do domínio N-terminal, e a
25 ausência deste domínio não permite a recuperação do fenótipo. Uma

1 proteína Rab, a Ypt6p, é capaz de suprimir o fenótipo diretamente. Sugerindo
2 que a ação da Yop1p não seja exclusivamente através da regulação da
3 Yip1p. Os domínios da Yop1p podem ter uma dupla ação regulando duas
4 vias de tráfego intracelular.

5 Em um outro estudo (Brands e Ho 2002) notou-se que o crescimento
6 da linhagem ΔYop a 37°C chegou a 75% do crescimento da linhagem
7 selvagem. Foram gerados mutantes, com um plasmídeo Ura3 de Yop1. Foi
8 identificado um mutante dependente de Yop1p. Este mutante (ABY51) foi
9 transformado com uma biblioteca. Além de pescar o próprio Yop1, foi
10 identificada a proteína YOR165W, denominada Sey1p (*Synthetic*
11 *enhancement with Yop1p*). Esta proteína contém dois motivos que predizem
12 ligação com GTP próximo ao N-terminal. O mutante ABY51 foi transformado
13 com a Yop1- Δ N-terminal (domínio de interação com a Yip1) e observou-se a
14 recuperação do fenótipo, mostrando que a porção N-terminal não é
15 necessária para sua função.

16 Um mutante $\Delta Sey1$ foi obtido que não demonstrou nenhuma diferença
17 de fenótipo com a linhagem selvagem. Foram gerados mutante da proteína
18 Sey1p. O mutante *sey1-4* tem uma mutação nonsense com perda de 60% da
19 proteína C-terminal, no entanto leva a um fenótipo termossensível (não
20 realizando *sectoring* a temperatura ambiente, mas realizando a 37°). Um
21 duplo mutante $\Delta Yop1/sey1-4$ foi gerado. Este mutante tem alterações na
22 secreção de invertase (Figura 10).

23 Finalmente não foi identificado interação através de dois híbridos em
24 levedura da Sey1p com Yop1p. Interação Yop1p com Yop1p foi identificada.

1 Existe uma interação biológica entre as proteínas Sey1p e Yop1p mas que
2 não ocorre diretamente.

3

4 Família Yip1

5

6 Foram propostos (Calero, Winand et al. 2002) critérios que agrupam
7 uma família de proteínas tendo a Yip1 como protótipo. A similaridade da
8 seqüência primária não seria o suficiente para predizer homologia tanto pelo
9 tamanho pequeno dessas proteínas quanto pelos domínios hidrofóbicos. São
10 três critérios: (1) topologia similar; todas tem domínio N-terminal solúvel
11 citosólico e domínio C-terminal com múltiplos domínios transmembranais. (2)
12 interação com proteínas Rab de maneira dependente da dupla prenilação. (3)
13 interação com outros membros da própria família. A Yop1p contempla esses
14 critérios. Neste estudo foram identificados duas proteínas preenchendo esses
15 critérios: YGL198W (denominada Yip4) e YGL161C (denominada Yip5).
16 Estas proteínas tem perfis de interações diferencial com as proteínas Rab
17 como visto na Figura 11. Possivelmente nem todas as interações tem
18 importância biológica, o que poderia ser testado em um modelo de duplo
19 mutante. Um mapeamento entre proteínas de levedura através de dois
20 híbridos foi realizado. Uma dos mapas de interação identificados tem relação
21 com Yip1p (Ito, Chiba et al. 2001).

22

23 Migração Vesicular

24

1 Para melhor elucidar a função das proteínas Yip1p e Yif1p foram
2 utilizados anticorpos (Barrowman, Wang et al. 2003) contra essas proteínas e
3 observado o seu efeito no transporte retículo para Golgi. Foi utilizado ensaio
4 com modelo *in vitro* de retículo para Golgi descrito acima. A presença de
5 anticorpo anti-Yif1p e anti-Yip1p levam a bloqueio da fusão (diminuição da
6 detecção da forma 26kd do fator em relação ao controle). Além do bloqueio
7 na fusão percebeu-se também uma diminuição da formação de vesículas.
8 Para se determinar o passo em que ocorre o bloqueio, foi feito novo ensaio,
9 onde as vesículas foram geradas na presença ou ausência do anticorpo. Por
10 meio de centrifugação a membrana doadora foi separada das vesículas.
11 Foram então misturadas com a fração contendo Golgi e complementadas
12 com o anticorpo se já não tinham sido expostos no passo anterior. Encontrou-
13 se que o bloqueio da fusão ocorre apenas se o anticorpo é colocada
14 previamente à geração das vesículas, visto na Figura 12.

15 Foi demonstrado que a migração vesicular é dependente da rab Ypt1
16 (Cao, Ballew et al. 1998). Ypt1p interfere na migração vesicular de forma
17 independente do Yif1p e Yip1p como é demonstrado na Figura 13. A
18 presença do anticorpo anti-Yif1p durante o brotamento vesicular, leva a
19 formação de vesículas que mudam da fração 5 para 7 após adição da fração
20 Golgi, sem no entanto apresentar detecção da cadeia externa de manose.
21 Infere-se que a vesícula foi transportada até o complexo de Golgi mas não
22 ocorreu fusão (Barrowman, Wang et al. 2003). Além disso, é demonstrado
23 que os anticorpos anti-Yip1 e anti-Yif1 não alteram a localização da rab Ypt1p
24 nas frações de gradiente de sacarose (Figura 14).

1 Em um grupo de pesquisa independente, utilizando-se o anticorpo anti-
2 Yip1p, confirmou-se a diminuição da geração de vesículas com a presença
3 do anticorpo (Heidtman, Chen et al. 2003). Anteriormente, não havia sido
4 descrito a necessidade das proteínas Yip1p ou Yif1p para formação de
5 vesículas COPII. A migração vesicular foi testado adicionando-se Uso1p. A
6 Figura 15 mostra que uma porção significativa de membranas difusíveis
7 passa a precipitar com membranas mais pesadas com a adição do Uso1p.
8 Infere-se que da mesma forma que no experimento anterior onde era
9 adicionado a fração citoplasmática contendo o Golgi, a adição do Uso1p
10 também promove a migração vesicular. Quando a fusão foi testada medindo-
11 se a forma final do ferormônio α -fator, constatou-se que a fusão não foi
12 alterada. Diferentemente do outro trabalho, a adição do anticorpo foi
13 realizada na presença de vesículas já formadas.

14 Em microscopia confocal pode se observar no mutante *yip1-4* um
15 acúmulo de retículo endoplasmático. No mutante Δ sec18, ocorre um acúmulo
16 de vesículas pequenas de 50-60nm. O duplo mutante *yip1-4*, Δ sec18, ao ser
17 colocado na temperatura restritiva, apresenta acúmulo de retículo sem
18 acúmulo de vesículas pequenas sugerindo interferência na geração de
19 vesículas. Adicionalmente no mutante *yip1-4*, o plasmídeo GFP-KDEL (KDEL
20 é um sinal N-terminal que direciona a sua proteína para o complexo de Golgi)
21 deu origem a fluorescência localizada no retículo endoplasmático. Foi
22 demonstrado de várias formas a ausência de brotamento vesicular do retículo
23 endoplasmático, a piora da capacidade de exportar proteínas do retículo,
24 manutenção da migração vesicular e fusão. Um mutante de um componente
25 da capa protéica COPII, a proteína Sec12p comporta-se de maneira similar

1 com o mesmo plasmídeo GFP-KDEL, acumulando mais evidências do papel
2 da Yip1p na maquinaria COPII.

3 Isto é reforçado pelo encontro de dupla letalidade do *yip1-4* com
4 *sec12*, *sec13*, *sec23* (proteínas de brotamento tipo COPII), *sec21* e *uso1-1*
5 (migração vesicular).

6 Foi feita análise da adição seqüencial dos fatores COPII e do anticorpo
7 anti-Yip1p conforme mostrado na Figura 16. A adição do anticorpo antes ou
8 junto dos fatores levou a inibição da formação de vesículas. Quando foram
9 separados os fatores COPII, a proteína Sar1p levou a uma resistência parcial
10 contra o anticorpo.

11 No estudo mais recente da molécula Yip1p (Chen, Calero et al. 2004)
12 foram gerados múltiplos mutantes ao longo de toda molécula. Foram
13 identificados dois domínios essenciais, cujos resíduos são conservados:
14 aminoácidos 70 e 130. Foram geradas tanto mutações letais, quanto
15 condicionais nestes sítios, representadas esquematicamente na Figura 17.
16 Uma mutação E70G sozinha que é letal, quando em conjunto com K130A é
17 recuperado para uma mutação condicional. Já outra mutação E70K (que é a
18 linhagem *yip1-4*, já mencionada acima) quando em conjunto com a mutação
19 K130E passar a ser letal. Fica demonstrada a interação entre esses resíduos.

20 A análise de dupla letalidade mostrada nas Tabelas 3 e 4 com
21 diferentes mutantes *yip1* mostra que as mutações que interagem com
22 proteínas da capa COPII também são as mesmas que interagem com as
23 proteínas Rab (no caso, *yip1-4* e *yip1-42*) e vice-versa (*yip1-2* e *yip1-40*).
24 Para se confirmar, Utilizou-se os mutantes *yip1-40* e *yip1-42*. O primeiro não
25 tem interação letal com as proteínas Rab ou com as proteínas COPII, já a

1 segunda tem ambas interações negativas. Foi feito o ensaio *in vitro* de
2 retículo para Golgi nesses mutantes com o α -ferormônio. O transporte foi
3 medido através da captação da forma de alto peso molecular. Observa-se na
4 Figura 18 que não há comprometimento no mutante *yip1-40* ao contrário do
5 *yip1-42*. Conclui-se então que a capacidade de interação com as proteínas
6 Rab correlaciona-se à capacidade de transporte vesicular.

7 A Yip1p participa então da geração da vesícula e de sua capacitação a
8 fusão. Não conseguiu definir-se a relação da yip com as proteínas Rab
9 apesar de reconhecimento desta interação ser necessária. Além disso
10 experimentos da fase final da fusão que combinem o uso do anticorpo anti-
11 Yip antes da geração vesicular seriam necessários para elucidar o
12 mecanismo através do qual acontece a capacitação da vesícula para fusão.

13

1 Referências

2

3 Barrowman, J., M. Sacher, et al. (2000). "TRAPP stably associates with the
4 Golgi and is required for vesicle docking." Embo J **19**(5): 862-9.

5 Barrowman, J., W. Wang, et al. (2003). "The Yip1p.Yif1p complex is required
6 for the fusion competence of endoplasmic reticulum-derived vesicles." J Biol
7 Chem **278**(22): 19878-84.

8 Benli, M., F. Doring, et al. (1996). "Two GTPase isoforms, Ypt31p and
9 Ypt32p, are essential for Golgi function in yeast." Embo J **15**(23): 6460-75.

10 Brands, A. e T. H. Ho (2002). "Function of a plant stress-induced gene,
11 HVA22. Synthetic enhancement screen with its yeast homolog reveals its role
12 in vesicular traffic." Plant Physiol **130**(3): 1121-31.

13 Buvelot Frei, S., P. B. Rahl, et al. (2006). "Bioinformatic and comparative
14 localization of Rab proteins reveals functional insights into the
15 uncharacterized GTPases Ypt10p and Ypt11p." Mol Cell Biol **26**(19): 7299-
16 317.

17 Calakos, N. e R. H. Scheller (1996). "Synaptic vesicle biogenesis, docking,
18 and fusion: a molecular description." Physiol Rev **76**(1): 1-29.

19 Calero, M., C. Z. Chen, et al. (2003). "Dual prenylation is required for Rab
20 protein localization and function." Mol Biol Cell **14**(5): 1852-67.

21 Calero, M., G. R. Whittaker, et al. (2001). "Yop1p, the yeast homolog of the
22 polyposis locus protein 1, interacts with Yip1p and negatively regulates cell
23 growth." J Biol Chem **276**(15): 12100-12.

1 Calero, M., N. J. Winand, et al. (2002). "Identification of the novel proteins
2 Yip4p and Yip5p as Rab GTPase interacting factors." FEBS Lett **515**(1-3): 89-
3 98.

4 Cao, X., N. Ballew, et al. (1998). "Initial docking of ER-derived vesicles
5 requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins." Embo J
6 **17**(8): 2156-65.

7 Chen, C. Z., M. Calero, et al. (2004). "Genetic analysis of yeast Yip1p function
8 reveals a requirement for Golgi-localized rab proteins and rab-Guanine
9 nucleotide dissociation inhibitor." Genetics **168**(4): 1827-41.

10 Desnoyers, L. e M. C. Seabra (1998). "Single prenyl-binding site on protein
11 prenyl transferases." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12266-70.

12 Gallwitz, D., C. Donath, et al. (1983). "A yeast gene encoding a protein
13 homologous to the human c-has/bas proto-oncogene product." Nature
14 **306**(5944): 704-7.

15 Grabowski, R. e D. Gallwitz (1997). "High-affinity binding of the yeast cis-
16 Golgi t-SNARE, Sed5p, to wild-type and mutant Sly1p, a modulator of
17 transport vesicle docking." FEBS Lett **411**(2-3): 169-72.

18 Heidtman, M., C. Z. Chen, et al. (2003). "A role for Yip1p in COPII vesicle
19 biogenesis." J Cell Biol **163**(1): 57-69.

20 Heidtman, M., C. Z. Chen, et al. (2005). "Yos1p is a novel subunit of the
21 Yip1p-Yif1p complex and is required for transport between the endoplasmic
22 reticulum and the Golgi complex." Mol Biol Cell **16**(4): 1673-83.

23 Ito, T., T. Chiba, et al. (2001). "A comprehensive two-hybrid analysis to
24 explore the yeast protein interactome." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4569-
25 74.

1 James, P., J. Halladay, et al. (1996). "Genomic libraries and a host strain
2 designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast." Genetics **144**(4):
3 1425-36.

4 Lazar, T., M. Gotte, et al. (1997). "Vesicular transport: how many Ypt/Rab-
5 GTPases make a eukaryotic cell?" Trends Biochem Sci **22**(12): 468-72.

6 Lian, J. P. e S. Ferro-Novick (1993). "Bos1p, an integral membrane protein of
7 the endoplasmic reticulum to Golgi transport vesicles, is required for their
8 fusion competence." Cell **73**(4): 735-45.

9 Lian, J. P., S. Stone, et al. (1994). "Ypt1p implicated in v-SNARE activation."
10 Nature **372**(6507): 698-701.

11 Lupashin, V. V., S. Hamamoto, et al. (1996). "Biochemical requirements for
12 the targeting and fusion of ER-derived transport vesicles with purified yeast
13 Golgi membranes." J Cell Biol **132**(3): 277-89.

14 Lupashin, V. V. e M. G. Waters (1997). "t-SNARE activation through transient
15 interaction with a rab-like guanosine triphosphatase." Science **276**(5316):
16 1255-8.

17 Matern, H., X. Yang, et al. (2000). "A novel Golgi membrane protein is part of
18 a GTPase-binding protein complex involved in vesicle targeting." Embo J
19 **19**(17): 4485-92.

20 Matsuoka, K., L. Orci, et al. (1998). "COPII-coated vesicle formation
21 reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes."
22 Cell **93**(2): 263-75.

23 Novick, P. e M. Zerial (1997). "The diversity of Rab proteins in vesicle
24 transport." Curr Opin Cell Biol **9**(4): 496-504.

1 Pevsner, J., S. C. Hsu, et al. (1994). "Specificity and regulation of a synaptic
2 vesicle docking complex." Neuron **13**(2): 353-61.

3 Rothman, J. E. (1994). "Mechanisms of intracellular protein transport." Nature
4 **372**(6501): 55-63.

5 Ruohola, H., A. K. Kabcenell, et al. (1988). "Reconstitution of protein transport
6 from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex in yeast: the acceptor
7 Golgi compartment is defective in the sec23 mutant." J Cell Biol **107**(4): 1465-
8 76.

9 Seabra, M. C. (1998). "Membrane association and targeting of prenylated
10 Ras-like GTPases." Cell Signal **10**(3): 167-72.

11 Sudhof, T. C. (1995). "The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein
12 interactions." Nature **375**(6533): 645-53.

13 Yang, X., H. T. Matern, et al. (1998). "Specific binding to a novel and essential
14 Golgi membrane protein (Yip1p) functionally links the transport GTPases
15 Ypt1p and Ypt31p." Embo J **17**(17): 4954-63

16

1

2 Figura 1. Interação física entre as proteínas SNARE, Sed5p e Ypt1p.

3 Imunoprecipitação com anticorpo anti-Sed5p e Sec22p de linhagem com ou

4 sem superexpressão de Ypt1p. O precipitado e sobrenadante foi submetido a

5 imunoblot com anticorpos anti-Sed5p, Sec22p e Ypt1p.

6

1

2 Figura 2. Mutantes *sec18*, *ypt1*, e duplo mutante *sec18/ypt1* (com plasmídeos
 3 de expressão de Ypt1p) e presença do complexo SNARE. WT: linhagem sem
 4 mutações. CEN: plasmídeo baseado em centrômero. Imunoprecipitação com
 5 Sed5p e imunoblot com Sed5p, Sec22p, Bet1p e Ypt1p.

6

1

2 Figura 3. Coprecipitação com proteínas SNARE e Sly1p. Imunoprecipitação
3 com Sed5p, Sly1p ou Sec22p e imunoblot com as mesmas proteínas do
4 precipitado ou sobrenadante.

5

1

2 Figura 4. Demonstração do trímero Yip1p, Yif1p e Yos1p. Imunoprecipitação
3 através da hemaglutinina e imunoblot com Yip1p, Yif1p-3xHA, Yos1p,
4 Sec61p, Sec22p e Ypt1p. T: amostra total. S: sobrenadante. IP:
5 imunoprecipitado.

6

1

2

3

4

5

6

7

8

Figura 5. Interferência dos mutantes do complexo trímico Yip1/Yif1/Yos1 na entrada de proteínas no Golgi para sua maturação. CPY: Carboxipeptidase Y. p1 e p2: formas precursoras da CPY. m ou mCPY: forma madura da CPY. pALP: forma precursora da fosfatase alcalina. mALP: forma madura da fosfatase alcalina.

Figura 6. Interferência da glicosilação e secreção da invertase nos mutantes *yip1* e *yif1*. Detecção de invertase em um gel de poliácridamida por uma marcação de atividade. WT: linhagem selvagem. S: forma secretada de alto peso molecular. ER: forma precursora presente no retículo endoplasmática. C: forma citoplasmática. I: fração intracelular. E: fração extracelular.

1

2 Figura 7. Presença das proteínas Yip1p e Yos1p em vesículas COPII. T:

3 extrato levedura total. - e +: microsossomos gerados in vitro na presença ou

4 ausência de proteínas COPII. Imunoblot com Sec61p, Sec22p, Yip1p e

5 Yos1p.

6

1

2 Figura 8. Letalidade da superexpressão da Yop1 completa (promotor de

3 galactose) é recuperada pela superexpressão concomitante de Yip1.

4 RCY376: superexpressão da Yop1 completa. RCY377: superexpressão da

5 Yop1-ΔN-terminal.

6

1

2 Figura 9. Interação da porção C-terminal da Yop1p e Ypt6p. Linhagem com
 3 superexpressão de Yop1- Δ N-terminal com promotor de galactose com
 4 plasmídeos multi-cópia Ypt6, Ypt7 e Dss4.

5

1

2 Figura 10. Influência do mutante *sey1-4* no transporte do retículo

3 endoplasmático para o Golgi. Porcentagem de invertase secretada sobre

4 invertase total. O gráfico da direita a linhagem utilizada foi $\Delta yop1/sey1-4$ na

5 presença dos episômas indicados em cada coluna do gráfico.

6

1

2

3 Figura 11. Parte superior: Mapa de interação do tipo dois híbridos onde a

4 flecha inicia na isca e aponta para a presa. Parte inferior: Quantificação de

5 interação do tipo dois híbridos pela atividade galactosidase entre proteínas da

6 família Yip e proteínas da maquinaria de vesículas.

7

1

2 Figura 12. Detecção da adição de cadeias de manose no ferormônio α -fator

3

1

2

3 Figura 13. Ação da proteína Yif1p na migração vesicular para o Golgi e
 4 conseqüente modificação pós-traducional. Detecção do ferormônio α -fator por
 5 concanavalina A em frações de gradiente de sacarose (nos gráficos
 6 superiores) e da cadeia externa de manose em frações de gradiente de
 7 sacarose no gráfico inferior.

8

1

2 Figura 14. Independência da localização da rab Ypt1p e os anticorpos anti-

3 Yip1p e anti-Yif1p. Fracionamento em gradiente de sacarose e detecção da

4 Ypt1p.

5

Figura 15. Anticorpos anti-Yip1p inibem o brotamento de vesículas mas não inibem a migração vesicular ou sua fusão. Gráfico superior-esquerda: células semi-intactas lavadas. Transporte para Golgi quantificado através da porcentagem de α -fator modificado pelo Golgi. Recon: Proteínas COPII, Uso1p e LMA1. Gráfico superior-direita e inferior: vesículas COPII misturadas com membranas aceptoras quando indicado. Migração vesicular avaliada pela contagem de vesículas difusíveis (fração α -fator precipitada a 18000g sobre α -fator total da amostra) (Cao, Ballew et al. 1998). Fusão avaliada por meio da porcentagem de α -fator modificado pelo Golgi.

1

2 Figura 16. Ação do anticorpo anti-Yip1p na interferência do brotamento

3 vesicular ocorre antes da presença das proteínas da capa COPII e da

4 proteína Sar1p. Análise da porcentagem de vesículas difusíveis (ver legenda

5 da Figura 15).

6

1

2 Figura 17. Mapa de hidrofobicidade da proteína Yip1p com sobreposição por

3 símbolos representando fenótipos diferentes com amino ácidos alterados.

4 Retângulo branco: mutação sem mudança no fenótipo. Círculo preto:

5 mutação letal. Retângulo semi-preenchido: mutação com fenótipo

6 condicionado à temperatura. Triângulo verde: fenótipo condicionado a

7 múltiplas mutações.

8

1 Tabela 1 Resumo de interações genéticas com *yip1-4*.

Categoria dos mutantes	Letais quando combinados a <i>yip1-4</i>	Viáveis quando combinados a <i>yip1-4</i>
Genes Rab	<i>ypt1^{A136D}</i> , <i>ypt1-3</i> , <i>Δypt31</i> , <i>ypt32^{A134D}</i> , <i>Δypt6</i>	<i>Δvps21</i> , <i>Δypt52</i> , <i>Δypt53</i> , <i>Δypt7</i> , <i>Δypt10</i> , <i>Δypt11</i> , <i>sec4-8</i>
Modificadores reguladores Rab	e <i>gdi1-11</i>	<i>sec2-41</i> , <i>bet3-1</i> , <i>Δgyp1</i> , <i>bet2-1</i>
Outros	Nenhum identificado	<i>Δopi1</i> , <i>sec7-1</i> , <i>sec14(ts)</i> , <i>Δdnm1</i>

2

3

1 Tabela 2 Resumo de viabilidade de duplo mutantes *yip1* com mutantes das
2 proteínas COPII e proteínas Rab.

Alelo <i>yip1</i>	Mutação	<i>ypt1</i> ^{A136D}	<i>ypt6Δ</i>	<i>gdi1-11</i>	<i>sec13-1</i>	<i>sec23-1</i>	<i>sec31-2</i>	<i>sec12-4</i>
<i>yip1-2</i>	G175K	+	+	+	-	+	+	+
<i>yip1-4</i>	E70K	-	-	-	-	-	-	-
<i>yip1-12</i>	L153G,M154G,S155G	+	+	+	-	+	+	+
<i>yip1-40</i>	E70G, K130A	+	+	+	-	-	±	±
<i>yip1-42</i>	E70V	±	±	+	-	-	±	+
<i>yip1-43</i>	E70A	+	+	+	-	+	±	+

(-): duplo mutante é inviável a 25°C; (+): duplo mutante é viável sem efeito deletérios sintéticos; (±): apesar da viabilidade do duplo mutante, o crescimento é restrito em relação aos mutantes individuais.

3
4

1
2 Figura 18. Mutantes como o *yip1-42* que tem diminuição de interação com
3 proteínas Rab e da capa COPII têm correspondente diminuição no transporte
4 vesicular de retículo para Golgi. WT: selvagem. Recon: proteínas COPII,
5 Uso1p, LMA1 e sistema de regeneração de ATP NA: tampão.

The *Leishmania major* HTBF protein belongs in the Yip family of proteins.

Marcelo R Pinto, Julio F M Marchini, Patrícia A A Buranello, Constance Oliver, Renato A Mortara, Luiz R O Tosi

Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Departamento de Microbiologia, Immunobiologia e Parasitologia. Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo

Introduction.

Through different protein machinery specialized in distinct process such as vesicle budding, transportation, targeting, fusion as well as specificity, cells are able to segregate populations of proteins into separate compartments. Domains present on soluble proteins themselves allow them to be selectively sieved into vesicles through interaction with a set of membrane proteins. COPII protein complex is involved in transport from the ER to Golgi, while the retrograde transport is based on COPI. Rab proteins take part in the targeting and fusion of vesicles along with soluble N-ethylamide sensitive factor attachment proteins receptors. These proteins also determine specificity of the target of the vesicle. The YIP family of proteins is proposed to function as recruiters of Ypt-Rab proteins to the membrane releasing them from their GDI chaperone. Yip1p protein¹, the prototype of YIP family² is characterized by four transmembranal domains, DLYGP and GY motifs. In yeast it has been shown to be part of a trimeric complex formed by Yos1p-Yip1p-Yif1p³ which is necessary for its function. Yip proteins and their ligands, Rab proteins and conserved across species and

possess homologs in distant species. Homologs to this complex, HsYip1 and HsYif1 have been described in *Homo sapiens*⁴. These homologues were also characterized functionally: localized to the golgi, interaction, and that golgi localization of HsYif1 depends on HsYip1A.

The availability of multiple complete genome sequences from diverse organisms allow analysis of protein conservation. The YIP domain has been registered as pfam 04893.6 protein domain also known as COG5080.2 conserved domain. As of September 2006, this domain is found in over 270 proteins in various organisms, namely *S. cerevisiae*, *H. sapiens* and *L. major*. Assuming these proteins form a conserved Rab interacting protein family, we test the hypothesis that HTBF from the *L. major* is included in this family.

Methods:

Culture and transfection of Leishmania. Clonal lines of *L. major*, LT252, CC1 clone (MHOM/IR/84/LT 252). *Leishmania* promastigotes were grown in M199 medium as described elsewhere⁵. M199 medium was supplemented as required with the appropriate aminoglycoside. Cells grown to late-log phase were transfected by electroporation (500μF; 2.25kV cm⁻¹). Stable transfectants were initially selected on 32μg mL⁻¹ of hygromycin B. Transfectants were named according to Clayton et al⁶, where the drug concentration (μg mL⁻¹) used in the selection of transfectants is indicated in superscript.

Bacteria, growth condition and molecular techniques. *E. coli* strain DH10B (Gibco BRL) was used in this study to maintain constructs and clones. The bacteria were grown in LB medium supplemented when necessary with the appropriate antibiotics (hygromycin B 50μg mL⁻¹; ampicillin 100μg mL⁻¹). Transformation of DNA was done by electroporation⁷. General

molecular methods were performed as described⁷. Episome DNA from bacteria and *Leishmania* were extracted using QIAGEN kits and DNA manipulation was carried out using restriction and modifying enzymes from Invitrogen and New England Biolabs. DNA samples were resolved by electrophoresis in 0.8% agarose gels. DNA fragments were purified using the QIAGEN QIAquick kit.

Cloning of the HTBF fusion. The HTBF-GFP fusion was cloned from the pXG-GFP and pELHYG-T1 plasmids. pXG-GFP was digested with *NheI* and *SaI* to eliminate a *BsrGI* site. Its ends were blunted with the large fragment of DNA polymerase (klenow) and was religated and digested with *BsrGI* and had its ends blunted with the same enzyme. This product was ligated to 668bp fragment generated from *BsaAI* digestion of pELHYG-T1.

The partial HTBF-GFP fusion was made using mariner transposition system with the GFP-KAN mariner. The mariner transposon inserts itself at random in TA sites. We generated 480 clones from the transposition that were sequenced and identified a fusion insertion at TA 130 (B05-5). The immediate flanking sequences are: CCTCTC-TA-GGAGG.

Cloning of the HTPF fusion with c-Myc tags. The c-Myc-HTBF fusion was cloned from the CS2+MT and PELHYG-T1 plasmids. The C-Myc-HTBF fusion was made using restriction enzymes *StuI* and *BsaAI*. The CS2+MT vector was digested with *StuI* enzyme origin blunt ends. This product was ligated to 668bp fragment generated from *BsaAI* digestion of pELHYG-T1.

Imunocitochemistry. The fusion products c-myc-HTBF and DsRed-YPT1 was co-stained

with was made with Anti-c-Myc (sigma) and GM 130 cis-Golgi marker (molecular probes) antibodies to fluorescence microscopy. To identify nuclei, cells were stained with DAPI (molecular probes).

Immunofluorescence microscopy. For immunofluorescence microscopy, Melanoma cell lines B16 were centrifuged from culture medium at 2,000 *g* and resuspended immediately in phosphate-buffered saline (PBS) containing 4% formaldehyde. Fixed cells were allowed to settle and attach onto poly-L-lysine-coated microscope slides. Labeling with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and different antibodies was performed as described previously (85). Cells were examined with a Leica DM RXA digital deconvolution microscope, and images were recorded using a digital charge-coupled-device camera (Hamamatsu).

Confocal Microscopy All confocal microscopy was performed on a Leica microscope (except the images showing the partial HTBF-GFP fusion which was performed at Dr. Renato Mortara's laboratory - UNIFESP). The GFP gene used was this plasmid contains a gene encoding a green fluorescence protein with a S65T⁸ mutation that allows for peak fluorescence at 488nm and less photobleaching compared to the wild-type⁹. Cells were washed multiple times in PBS and observed *in vivo* at the concentration of 5E7 parasites per mL diluted 1:1 with 2% low melting point agarose. DsRed was excited at 558 nm and its emission was captured at 583nm.

Statistical analysis. Terbinafine fold resistance was determined for each strain and transfectance. Fold resistance were compared using Student T-test with a p value of significance at 0,01.

Results

1. Sequence and phylogenetic analyses.

We studied the sequence of leishmanial proteins HTBF and LmYPT in the *Leishmania* genome. A search for related YIP proteins in the *Leishmania major* genome revealed two loose matches (Table 1). A rab protein search was also performed revealing 20 homologues (Table 2) that have already been characterized in a recent review¹⁰.

An analysis of the Rab proteins reveals some conserved domains. Notably the sigma 54 interacting motif: [LIVMFY](3)-x-G-[DEQ]-[STE]-G-[STAV]-G-K-x(2)-[LIVMFY] is identified¹¹. The sequence of LmYPT predicts little hydrophobicity, Figure 1, and no transmembrane domains¹², leading to the conclusion that it is a soluble protein. HTBF's sequence predicts a hydrophobic protein in its c-terminal domain with four transmembranal domains, Figure 2, fulfilling the first criteria for inclusion within the yip family.

We carried out a phylogenetic analysis of human, yeast and leishmanial YIP proteins. The proteins were aligned using Clustal W¹⁵ and the PMB model¹⁶ for aminoacid substitution was used to generate a phylogenetic tree. YIP proteins contain the motif DLYGP with variations (such as ELYGP, DLYIP, DLWGP, DFWGP and DLAGP)¹³. In the Figure 3 we can see that Yip1p is as close a homologue to HTBF as it is to HsYip1A. Table 3 presents identity and similarity data between these same proteins. HTBF has a 20,1% and 15,7% identity to the yeast and human homologues, whereas these proteins bear an 17,4% identity to each other. New YIP proteins have been identified in the L major genome in chromosomes 26 and 30. These proteins bear a 11,2% and 15% identity respectively to the HTBF protein, and 15,1% identity between themselves.

2. *Leishmania* proteins localize to specific compartments when expressed in human cells

To demonstrate an aspect of functional homology of rab proteins and YIP proteins between *Leishmania* and human cells we constructed fusions of *Leishmania* YPT to a fluorescent protein, eGFP and HTBF to an epitope, c-myc tag. YPT fusion was transfected in HeLa cells whereas HTBF fusion was transfected to cos-7 cell line. Both were co-transfected in HeLa cells. We investigated the subcellular localization of *Leishmania* LmYPT and HTBF by indirect immunofluorescence and together with Golgi marker, WGA and 58kDa Golgi monoclonal antibody. WGA has affinity to glycoproteins and is concentrated within the Golgi apparatus in permeabilized cells. 58kDa protein is an enzyme that catalyzes tetrahydropholate biosynthesis. It is a dynamic component of Golgi and cycles between Golgi and earlier compartments. Immunofluorescence microscopy, shown in Figure 4, of cos-7 cells shows HTBF in a typical Golgi region next to the nucleus. Confocal microscopy of HeLa cells show WGA-594 in a classic Golgi delineation. YPT-eGFP co-localizes to WGA-594. Co-transfected Hela cells demonstrate co-localization to each other.

HTBF-GFP fusion and the partial HTBF-GFP was transfected into LT252 leishmania. In Figure 2 we can observe the hydrophobicity plots for the original HTBF protein and the generated fusions. The original HTBF protein is predicted to have four transmembranal alpha-helical domains. In the HTBF-GFP fusion all the transmembranal domains have been maintained. Only 6 residues from the amino terminal end have been lost. Functional GFP fusions to both protein ends have been described¹⁷. In the partial HTBF-GFP fusion, these domains would be coded after the GFP fusion and its stop codon, leaving them out of the product of this fusion. In the superior panel of Figure 5 shows a diffuse pattern covering the

cell projection of the partial HTBF-GFP fusion, in sharp contrast to the inferior panel of Figure 5 where the full HTBF-GFP fusion is restricted a membrane region. To identify this region, HTBF-GFP fusion transfectants were permeabilized and incubated with WGA-594 to mark the compartments with glycosilated proteins, for the most part, the Golgi apparatus. In Figure 6 we observe WGA-594 in a typical Golgi delineation, as well as co-localization of HTBF-GFP fusion with WGA-594. In a second assay, we incubated the same transfectants with FM4-64, that is endocytosed by the parasite, marking the flagellar pocket, endocytic pathway as well as multivesicular tube-lysosome (MVT-lysosome). Figure 7 demonstrates partial colocalization with FM4-64 in the flagellar pole, suggesting flagellar pocket localization.

3. Superexpression of LmYPT and its interference in HTBF function

To further examine the functional relationship between HTBF and LmYPT, we employed terbinafine to analyze for a modulation of its resistance. LmYPT was transfected into LT252 and was maintained at $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of G418 as well as $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ generating LT[pXG¹⁶C3] (C3-16) and LT[pXG²⁰⁰C3] (C3-200). LmYPT was also transfected onto LT[pELHYG⁵⁰⁰T1] (T1-500) and was maintained at $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LT[pELHYG⁵⁰⁰T1.pXG¹⁶C3] (T1-500.C3-16). These transfectants were submitted to terbinafine resistance assays as shown in Figures 8 and 9. All values are the mean and the standard error from three separate experiments.

Plasmid expression of LmYPT did not increase the resistance phenotype in the wild type strain. Putative increased expression of LmYPT induced by higher selection drug concentration (G418) not only did not increase the resistance phenotype from the wild-type strain but instead was even more sensitive to the terbinafine than the wild-type ($p<0,01$).

Resistance conferred to by the overexpression of T1 at 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of hygromycin B is lost when co-expressed with LmYPT plasmid expression at low ($16\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) or high ($200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) levels of G418 ($p<0,01$). The rescued lineage of T1 at 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (losing the G418 resistance) recovers the resistance phenotype.

Discussion

Considering the virtual completion of *L. major* genome sequencing, two loose YIP homologues were identified in it in contrast to the 20 different Rab proteins in the complete genome. These 20 proteins possess a strong conservation starting from the n-terminal of the protein suggesting derivation from a common protein and sharing a common function or ligand. On the other hand, the c-terminal region of over 50 residues had no conservation of residues, indicating a domain of specificity. Considering the lack of close matches to HTBF, this protein in *L. major* could be expected to interact in a non selective fashion to its targets. Its effects then would be determined largely by the relative frequency of its putative targets, namely the different Rab proteins.

In light of this hypothetical model, when LmYPT is superexpressed in the terbinafine resistance transfectant T1500 the loss of resistance would be explained by the diversion of HTBF function to another pathway, impairing the resistance pathway. The rescuing of terbinafine resistance upon loss of the LmYPT plasmid confirms that no additional alteration was suffered by the pathogen during its co-transfection and supports this conclusion. This experiment is also a confirmation of an interaction between HTBF and LmYPT, not necessarily direct.

Assuming HTBF protein resides at the target membrane as is predicted in the YIP1P

model, this adds support to the theory that HTBF is involved in the subcellular traffic way related to extrusion of harmful substances contained in vesicles. These vesicles could in their turn have been filled with other various proteins such as MRPA whose genes are all in the same region, the H region that amplifies during drug pressure. This reasoning supports the H region to function as a multiple drug resistance *loci* in leishmania.

HTBF has been described elsewhere¹⁸. It is a putative integral membrane protein encompassing 4 transmembrane domains. We show that these localize to a specific compartment within the parasite and that these transmembrane domains are in fact necessary for localization of the protein to the Golgi apparatus. The n-terminal portion is insufficient to localize the protein in the flagellar pocket leaving it non specifically in the cytoplasm. HTBF homolog in yeast, Yip1p has located in the golgi, along with two other proteins Yos1p and Yif1p. This interaction has been demonstrated in *in vivo* and *in vitro* models. It has also been demonstrated that human homologs HsYif and HsYip1A also form a complex.

We have shown that *Leishmania* proteins can be expressed and localized to the correct compartment in cells of a different kingdom. Considering Cavalier-Smith's model of evolutionary classification this would place Rab protein interaction with the Yip family before the division of Eukaryota into Bikonta, to which *Leishmania* belongs and Unikonta, from which Fungi and Animal kingdoms derive^{19, 20}. This adds support to the hypothesis that vesicle and membrane trafficking mechanisms must have been established from the onset of cell compartmentalization in a primitive eukaryote cell ancestor and remained conserved ever since.

References

- 1 1. Yang X, Matern HT, Gallwitz D. Specific binding to a novel and essential Golgi
2 membrane protein (Yip1p) functionally links the transport GTPases Ypt1p and Ypt31p. *Embo*
3 *J.* 1998; 17(17):4954-63.
4
- 5 2. Calero M, Winand NJ, Collins RN. Identification of the novel proteins Yip4p and Yip5p
6 as Rab GTPase interacting factors. *FEBS Lett.* 2002; 515(1-3):89-98.
7
- 8 3. Heidtman M, Chen CZ, Collins RN, Barlowe C. Yos1p is a novel subunit of the Yip1p-
9 Yif1p complex and is required for transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi
10 complex. *Mol Biol Cell.* 2005; 16(4):1673-83.
11
- 12 4. Jin C, Zhang Y, Zhu H, Ahmed K, Fu C, Yao X. Human Yip1A specifies the localization
13 of Yif1 to the Golgi apparatus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 334(1):16-22.
14
- 15 5. Kapler GM, Coburn CM, Beverley SM. Stable transfection of the human parasite
16 *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication
17 and expression. *Mol Cell Biol.* 1990; 10(3):1084-94.
18
- 19 6. Clayton C, Adams M, Almeida R, Baltz T, Barrett M, Bastien P, et al. Genetic
20 nomenclature for *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 1998; 97(1-2):221-4.
21
- 22 7. Sambrook J, Fritsch EH, Maniatis T. *Molecular cloning. A Laboratory Manual.* 1989;
23
- 24 8. Garraway LA, Tosi LR, Wang Y, Moore JB, Dobson DE, Beverley SM. Insertional
25 mutagenesis by a modified in vitro Ty1 transposition system. *Gene.* 1997; 198(1-2):27-35.

9. Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci.* 1995; 20(11):448-55.
10. Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science.* 2005; 309(5733):416-22.
11. Austin S, Kundrot C, Dixon R. Influence of a mutation in the putative nucleotide binding site of the nitrogen regulatory protein NTRC on its positive control function. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19(9):2281-7.
12. Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics.* 1998; 14(4):378-9.
13. Stolle K, Schnoor M, Fuellen G, Spitzer M, Engel T, Spener F, et al. Cloning, cellular localization, genomic organization, and tissue-specific expression of the TGFbeta1-inducible SMAP-5 gene. *Gene.* 2005; 351:119-30.
14. Henikoff S, Henikoff JG. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(22):10915-9.
15. Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, et al. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(13):3497-500.

- 1
- 2 16. Veerassamy S, Smith A, Tillier ER. A transition probability model for amino acid
3 substitutions from blocks. J Comput Biol. 2003; 10(6):997-1010.
- 4
- 5 17. Besteiro S, Coombs GH, Mottram JC. The SNARE protein family of Leishmania major.
6 BMC Genomics. 2006; 7:250.
- 7
- 8 18. Marchini JF, Cruz AK, Beverley SM, Tosi LR. The H region HTBF gene mediates
9 terbinafine resistance in Leishmania major. Mol Biochem Parasitol. 2003; 131(1):77-81.
- 10
- 11 19. Keeling PJ, Burger G, Durnford DG, Lang BF, Lee RW, Pearlman RE, et al. The tree of
12 eukaryotes. Trends Ecol Evol. 2005; 20(12):670-6.
- 13
- 14 20. Cavalier-Smith T. Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa.
15 European Journal of Protistology. 2003; 39(4):338-48.
- 16
- 17 21. Betts MJ, Russell RB, *Amino acid properties and consequences of substitutions.*, in
18 *Bioinformatics for Geneticists*, M.R. Barnes and I.C. Gray, Editors. 2003, Wiley.
- 19

Table 1. Proteins with the YIP domain in the *L. major* genome.

Nome	GI	Resíduos	E Va-	Cromossomo	Locus	Motif
HTBF	29374033	189		23	LmjF23.0240	DLWGP
YIP	68127294	531	0.017	26	LmjF26.2200	DLAGP
YIP	68127673	346	-	30	LmjF30.0140	DLYGP

1 Table 2. LmYPT related proteins in the *L. major* genome.

2 aa: aminoacid number. Crom: cromossome.

Nome	GI	aa	E Value	Crom.	Locus
LmYPT (Rab1a)	349484	200		27	LmjF27.0760
Rab-2a	68128597	211	5,00E-43	32	LmjF32.2030
Rab11	68124721	208	4,00E-38	10	LmjF10.0910
Rab-4	68128436	203	2,00E-36	32	LmjF32.0490
Rab1	68124746	216	1,00E-35	10	LmjF10.1160
Rab-14	68124255	225	2,00E-34	7	LmjF07.0560
Rab18	68129017	217	1,00E-33	33	LmjF33.1840
Rab7	68125949	223	8,00E-30	18	LmjF18.0890
Rab6-like	70799857	274	2,00E-28	2	LMJ_0111
Rab7	68124747	221	6,00E-28	10	LmjF10.1170
small Rab	68125065	212	5,00E-26	13	LmjF13.0220
Rab-5	68125973	236	2,00E-25	18	LmjF18.1130
small G protein	68130288	297	2,00E-22	36	LmjF36.6250
Rab28	68127845	235	8,00E-22	30	LmjF30.1710
GTP-binding	68126964	216	3,00E-21	25	LmjF25.1420
Rab-21	68223897	288	4,00E-21	21	LmjF21.0790
guanine nucleo-	68125291	416	8,00E-21	14	LmjF14.0760
Rab11B	68128575	224	1,00E-19	32	LmjF32.1840
Ras like	68124554	335	1,00E-15	9	LmjF09.0850

3

Table 3. Percent Identity BLOSUM62 method¹⁴.

Similarity\Identity	1	2	3	4	5	6	7	8
1. gi 40538797 Yip1 [Homo sapiens]		22.	14.	15.	17.	22.	15.	15.
2. gi 68127673 [Leishmania major crom 30]	39.		15.	15.	14.	20.	17.	15.
3. gi 68127294 [Leishmania major crom 26]	22.	27.		11.	15.	13.	12.	12.
4. gi 29374033 HTBF [Leishmania major]	25.	24.	17.		20.	14.	19.	21.
5. gi 6321611Yip1p [Saccharomyces cerevisiae]	32.	28.	24.	33.		17.	18.	19.
6. gi 6321277Yip5p [Saccharomyces cerevisiae]	38.	35.	23.	28.	35.		16.	16.
7. gi 1177630 [Saccharomyces cerevisiae]	36.	30.	21.	32.	35.	31.		85.
8. gi 41629692 Yip4p [Saccharomyces cerevisiae]	33.	28.	22.	37.	36.	31.	85.

Figure 1. Hydrophobicity of LmYPT

HTBF and GFP-HTBF

HTBF and HTBF-GFPKAN mariner

Figure 2. Hydropobicity and expected alpha-helices comparison of HTBF protein and its GFP fusions¹². The first fusion is predicted to be an integral membranal proteins where as is the other one is soluble. Dotted line in first comparison represents residue before which constructs differ and in the second comparison the dotted line represents residue after which constructs differ.

Figure 3. Phylogenetic tree of HTBF homologues in Leishmania, Yeast and Man

Figure 4. *HTBF* subcellular localization. Cos7 green african monkey kidney cells were transfected with the c-myc::HTBF fusion. Immunofluorescence was performed using the monoclonal anti-c-Myc antibody 9E10. Alexa 488 fluocrome secondary antibody was used in conjunction; DAPI coloration was added. The fusion product localized to the golgi complex. 600X.

Figure 5. HTBF-GFP fusion and partial HTBF-GFP fusion in confocal microscopy (superimposed on DIC image, in shades of gray).

Figure 6. HTBF-GFP fusion transfectant observed *in vivo* in confocal microscopy in the presence of 58K marking the Golgi complex. Co-localization is observed with HTBF and 58K.

1

2 Figure 7. HTBF-GFP fusion transfectant observed *in vivo* in confocal microscopy in the
 3 presence of FM4-64 marking the flagellar pocket, endocytic pathway and multivesicular tube-
 4 lysosome. A weak co-localization is observed in the compartment nearest to the flagellar pole
 5 of the parasite.

Figure 8. *C3 terbinafine resistance assay.* Relative growth of wild type LT252 (●) and C3 transfectants in rising terbinafine concentrations. (Left) C3-200 transfectant (▽). (Right) C3-16 transfectant (▼). No statistical difference in fold resistance between C3-16 and LT252 whereas it was present when transfectant C3-200 and wild-type LT252 were compared ($p < 0,01$).

Figure 9. T1-500.C3-16 transfectant and rescued transfectant terbinafine resistance assay. Relative growth of wild-type LT252 (■); T1-500 (▼), and SF-R30 (▲). T1-500.C3-16 co-transfectant (●) (left), T1-500, C3 rescued, transfectant (●) (right), in rising terbinafine concentrations. T1-500.C3-16 was not statistically different from the wild-type where as the rescued transfectant was ($p < 0.01$).