UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
JEZIEL DENER DAMASCENO

**Caracterização molecular do envolvimento das
proteínas LmHus1 e LmRad9 em mecanismos de
reconhecimento e reparo de DNA no parasito
*Leishmania major***

Ribeirão Preto – SP

2013

JEZIEL DENER DAMASCENO

Caracterização molecular do envolvimento das
proteínas LmHus1 e LmRad9 em mecanismos de
reconhecimento e reparo de DNA no parasito
Leishmania major

Versão Corrigida

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Biologia
Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi

Ribeirão Preto – SP

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Damasceno, Jeziel Dener

Caracterização molecular do envolvimento das proteínas LmHus1 e LmRad9 em mecanismos de reconhecimento e reparo de DNA no parasito *Leishmania major*/Jeziel Dener Damasceno; orientador: Tosi, Luiz Ricardo Orsini – Ribeirão Preto, 2013.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Descritores: 1. Detecção de danos no DNA 2. Reparo de DNA 3. Estabilidade genômica 4. Instabilidade genômica 5. Plasticidade genômica 6. *Leishmania* 7. Tripanossomatídeos 8. Heterotrímero complexo 9-1-1 9. Hus1 10. Rad9 11. Rad1 12. RPA 13. Homotrímero PCNA.

DAMASCENO, Jeziel Dener. **Caracterização molecular do envolvimento das proteínas LmHus1 e LmRad9 em mecanismos de reconhecimento e reparo de DNA no parasito *Leishmania major*.** Tese apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Aprovado em: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

O cientista Stephen J. Gould disse que toda ciência e, na verdade, toda descoberta, devem ocorrer como consequência de um contexto social e intelectual – que tanto pode promover as descobertas como cercear a reflexão. A realização deste trabalho só foi possível por conta de um contexto social e intelectual cuja configuração eu não posso e não devo ignorar. A partir da análise desse cenário, eu agradeço especialmente aqueles que contribuíram para a promoção da descoberta. Estes, em oposição aos cerceadores, compreenderam que o trabalho que desenvolvemos durante estes últimos anos foi a manifestação de uma curiosidade. Uma curiosidade genuína, e não um mero capricho pessoal e egoísta, de entender um pouco mais os meandros do fascinante universo dos processos biológicos.

O incentivo e o apoio dado pelo **Prof. Dr. Luiz. R. O. Tosi** é de relevância ainda maior do que a de ter-me apresentado à obra de Gould. Eles foram determinantes para a viabilização deste trabalho. Agradeço por ter me acolhido em seu laboratório e, não diferente do que sempre fez com qualquer outro aluno que quisesse discutir o respectivo trabalho, esteve sempre à disposição para fazê-lo comigo. Com seu envolvimento até na realização de experimentos e com sua postura sensata e crítica em relação à produção do seu laboratório, nunca deixou de apontar francamente os equívocos de seus alunos assim como os acertos. Dessa forma, aprendi que a investigação científica feita apenas como capricho e sem o devido rigor, atravanca o avanço do conhecimento em lugar de promovê-lo.

A sua contribuição se estende para além dos limites do seu laboratório. Junto com a **Prof. Dra. Angela K. Cruz** ministra o curso Aspectos Moleculares da Biologia de Parasitas Protozoários sem o qual teria sido árduo ao invés de divertido familiarizar-me com a biologia destes intrigantes parasitas, os tripanossomatídeos. Agradeço a Dra. **Angela** também pela disponibilidade nas muitas ocasiões de que dela precisei, pois foi sempre muito prestativa comigo e também com toda equipe do nosso laboratório, ao disponibilizar seu espaço e até reagentes. A **equipe do seu laboratório** sempre foi de igual presteza e certamente tem a minha gratidão.

Agradeço também a **Tânia Defina** e **Viviane Ambrósio** pelo apoio técnico sempre presente. E também **Marlei Josieli Augusto** e **Roseli Ferreira** que contribuíram para o bom andamento deste trabalho. Não posso deixar de mencionar o **Sr. Domingos** (do biotério), **Liliana Moura** e **Raimundo Freire** pela contribuição na geração dos anticorpos. **Elizabete Milani** pela assistência no confocal e as secretárias do nosso

Programa de Pós Graduação **Lúcia Helena, Camila Fabris, Rosangela Catarina e Gabriela Zamonier** que estão sempre dispostas a atender os alunos.

Deixo aqui também meu agradecimento a Dra. **Nádia Monesi**, Dra. **Enilza Espreafico**, Dr. **Maria Luiza Paçó-Larson** e Dr. **Eduardo Brandt** pela inegável contribuição para minha formação acadêmica por intermédio dos cursos que ministram com maestria. Sou grato ao Dr. **Benedito Fonseca** por ter-me possibilitado a oportunidade de ir para a Universidade de Yale e também ao Dr. **Christian Tschudi** e Dra. **Elisabetta Ullu** por terem me acolhido ali de tão bom grado e influenciarem de maneira determinante o meu olhar sobre a ciência. Agradeço também a Dra. **Munira Baqui** por disponibilizar reagentes e pela ajuda no confocal e a Dra. **Maria Isabel Cano** pelo anticorpo disponibilizado.

Obrigado também aos membros da banca examinadora da defesa desta tese, pela prontidão para se deslocarem até aqui: Dr. **Carlos F. M. Menck**, Dra. **Juliana L. R. Fietto**, Dr. **Sergio Schenkman** e também a Dra. **Angela K. Cruz**. Agradeço também à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** que financiou a maior parte dos recursos destinados a este trabalho, no âmbito dos projetos **2007/54504-9** e **2011/50489-0** e a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** cujo recurso financeiro através do projeto **5969/11-5** também foi de grande importância.

E agradeço ao alicerce e cerne da minha formação pessoal, **minha família**: minha querida e amada mãe, **Maria Conceição**, e meu querido e amado pai, **José Batista**, pelo amor e por suas orações. Meus irmãos queridos **Gilmara, Cassia, Marcia e Flávio** por serem meu apoio emocional, e também financeiro, em todos os momentos nesta jornada. Minhas queridas sobrinhas **Geysla, Géssica, Gisele, Débora e Kamilla** por também me fazerem sentir muito querido. Agradeço minha querida família de Ribeirão Preto: **Neide, Tony, Tania, Taise e Taty** por terem me abrigado quando aqui cheguei e também por me fazer sentir querido. Finalmente, não posso deixar de agradecer o apoio salvador que recebi dos meus queridos amigos **Fabio Dornas e Rafael Peixoto**. Obrigado também a **Luiz Franco (Beraba)** por conviver com minha ausência quase constante.

Espero ter sido justo ao agradecer vocês que promoveram o bom andamento deste trabalho, pois nas palavras de S. J. Gould “a história não se desenrola ao longo de uma linha progressiva, e o passado não se resume a um período antigo e adverso a ser superado e rejeitado em função de sua inevitável obsolescência”.

APOIO

Este trabalho foi realizado com o apoio do **Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, no âmbito do **Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular**.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** financiou a maior parte dos recursos destinados a este trabalho, no âmbito do projeto **2007/54504-9**.

Parte deste trabalho também foi financiada pela **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** com o projeto **5969/11-5** e pelo **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**.

RESUMO

DAMASCENO, J. D. **Caracterização molecular do envolvimento das proteínas LmHus1 e LmRad9 em mecanismos de reconhecimento e reparo de DNA no parasito *Leishmania major***. 2013. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A estabilidade genômica é condição essencial à sobrevivência e ao funcionamento dos organismos vivos. No entanto, várias situações podem provocar danos no DNA. Por exemplo, cerca de 10^4 lesões podem ocorrer no material genético de uma célula de mamífero a cada dia. No intuito de preservar a integridade genômica e contornar os efeitos deletérios destas modificações, uma maquinaria constituída de proteínas especializadas em reconhecer e reparar estes danos foi selecionada ao longo do curso evolutivo. Defeitos em proteínas destas maquinarias causam instabilidade genômica e pode resultar em elevada taxa de mutações e quebras do DNA que resultam em eventos de amplificação gênica, como em células cancerosas. De uma maneira aparentemente contrária ao requerimento de estabilidade genômica como condição primordial para a perpetuação da vida, *Leishmania* apresenta um genoma notavelmente maleável e explora a amplificação gênica como recurso de sobrevivência. Ainda que a plasticidade genômica em *Leishmania* seja facilmente demonstrada, nós não conhecemos os mecanismos precisos pelos quais este parasita coordena a ação da maquinaria de detecção de danos no DNA e a consumação dos eventos de amplificação gênica. No intuito de contribuir para a compreensão deste processo, nós identificamos proteínas homólogas do complexo 9-1-1 (Rad9-Hus1-Rad1) em *Leishmania major*. As proteínas LmHus1 e LmRad9 apresentam marcada divergência estrutural em relação aos seus homólogos em outros eucariotos e nenhuma proteína obviamente homóloga a Rad1 foi identificada neste parasita. Análises filogenéticas indicam que LmHus1 e LmRad9 são relacionadas ao complexos heterotriméricos envolvidos na detecção de danos no DNA. Em acordo com isso, nossos experimentos demonstram que alteração nos níveis destas proteínas interfere na capacidade do parasita em lidar com estresse genotóxico. LmHus1 localiza-se no núcleo, é requerida para o crescimento normal deste parasita e a diminuição de sua expressão compromete mecanismos de controle de ciclo celular e manutenção de telômeros. LmRad9 também localiza-se no núcleo e sua superexpressão

causa defeito de crescimento e de resposta ao estresse genotóxico em *L. major*. Nós observamos que LmHus1 e LmRad9 formam um complexo responsivo ao dano no DNA *in vivo*, uma forte indicação de que o complexo 9-1-1 tenha sido conservado em *L. major*. As peculiaridades estruturais destas proteínas sugerem que o complexo 9-1-1 de *L. major* possua uma arquitetura distinta em comparação aos eucariotos superiores. Em adição a isto, outras proteínas, tais como a LmRpa1, também apresentam uma marcante divergência estrutural. Isso sugere que a via de sinalização de danos no DNA envolvendo o complexo 9-1-1 e Rpa1 de *L. major* possua mecanismos peculiares de ação. Estas observações podem permitir entender como ocorreu o processo evolutivo da sinalização mediada pelo complexo 9-1-1 nos eucariotos, além de ajudar para o entendimento das bases moleculares de como este parasito conduz os eventos de amplificação gênica.

Palavras chave: Detecção de danos no DNA; reparo de DNA; estabilidade genômica; instabilidade genômica; plasticidade genômica; *Leishmania*; tripanossomatídeos; heterotrímero complexo 9-1-1; Hus1; Rad9; Rad1; RPA; homotrímero PCNA.

SUMMARY

DAMASCENO, J. D. **Molecular characterization of the involvement of LmHus1 and LmRad9 in DNA damage sensing and repair in the parasite *Leishmania major*.** 2013. Thesis (Doctorate) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Genome stability is an essential condition for survival and proper functioning of living organisms. However, a broad range of elements may lead to DNA damage. For instance, about 10^4 DNA lesions may be inflicted upon any given mammalian cell everyday. In order to maintain the genome integrity and circumvent the deleterious effects of these lesions, a molecular machinery composed of proteins specialized in detecting and repairing DNA damage has been selected in evolution. Defects of the proteins that constitute such machineries may result not only in a high mutation rate, but also in breaks in the DNA structure that can mediate gene amplification as observed in cancer cells. In an apparent opposition to such requirement for stability as an essential condition to life, the protozoan *Leishmania* presents a highly malleable genome and explores genome amplification as a survival and adaptation tool. Despite of the fact that the *Leishmania* genome plasticity can be easily demonstrated, the precise mechanisms that coordinate the molecular machineries involved in the detection and signaling of DNA damage, and in the regulation of gene amplification is still largely unknown. In order to contribute to a better understanding of these processes, we identified and studied the *Leishmania major* proteins that are homologues of those proteins that compose the 9-1-1 complex (Rad9-Hus1-Rad1). The proteins LmHus1 and LmRad9 present a high structural divergence when compared to its homologues from other eukaryotes and no obvious homologue of Rad1 was identified in the parasite genome. Phylogeny analysis indicated that LmHus1 and LmRad9 are closely related to heterotrimeric complexes involved in the detection of DNA damage. In accordance to that, our experiments demonstrated that altered levels of these proteins interfere with the parasite ability to deal with genotoxic stress. Moreover, LmHus1 was localized to the parasite nucleus and is a required protein for normal parasite proliferation. Besides, we showed that decreased levels of LmHus1 compromise cell cycle regulation and the maintenance of telomeres. LmRad9 was also shown to be localized to the cell nucleus

and its overexpression led to growth defects and affected the *L. major* response to genotoxic stress. We also observed that LmHus1 and LmRad9 interact with each other to form a protein complex that is responsive to DNA damage *in vivo*, which strongly suggested that the 9-1-1 complex was conserved in *L. major*. The structural peculiarities of these proteins indicate that the possible *L. major* 9-1-1 complex has a different architecture when compared to the complex found in higher eukaryotes. In addition to that, other proteins, such as LmRpa1, also present a marked structural divergence. Altogether, these findings suggest that the DNA damage signaling pathway involving the 9-1-1 complex and LmRpa1 in *L. major*, may present a peculiar mode of action. These observations may contribute to a better understanding not only of the evolution of the signaling pathway mediated by the 9-1-1 complex in eukaryotes, but also of the molecular basis of the genome plasticity and the gene amplification phenomenon.

Keywords: DNA damage sensing; DNA repair; genome instability; genome plasticity; *Leishmania*; trypanosomatids; heterotrimeric 9-1-1 complex; Hus1; Rad9; Rad1; RPA; PCNA homotrimer.

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

°C – grau celsius

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (ferramenta para procura de alinhamento local)

BSA – *Bovin Serum Albumin* (Soro-albumina Bovina)

CPT - Camptotecina

DAPI - 4,6-diamidino-2-fenilindole

DNA – *Deoxiribonucleic Acid* (Ácido Deoxirribonucleico)

DTT - Dithiothreitol

h - hora

HU - Hidroxiuréia

IPTG - isopropilthio- β -galactosideo

kb - kilobases

kDa - kilodalton

L - litro

M - molar

mA - miliamps

mg - miligrama

min - minuto

mL - mililitro

mm - milimetro

mM - milimolar

MMS – Metil metanosulfonato

ng - nanograma

ORF – *Open Reading Frame* (Fase Aberta de Leitura)

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Solução Salina Tamponada com Fosfato: NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 10mM; KH₂PO₄; pH7,5)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da DNA Polimerase)

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

RPM – Rotações Por Minuto

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)

SDS-PAGE – *Polyacrylamide Gel Electrophoresis with SDS* (Eltroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS)

seg - segundos

V - volt

WT – *Wild Type* (linhagem de célula do tipo selvagem)

μ g - micrograma

μ L - microlitro

μ M - micromolar

ÍNDICE

RESUMO.....	8
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. A LEISHMANIA E LEISHMANIOSES	16
1.1.1. A REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES EM <i>LEISHMANIA</i> : O PAPEL DA AMPLIFICAÇÃO GÊNICA	19
1.2. ESTABILIDADE GENÔMICA: DETECÇÃO E REPARO DE DANOS NO DNA.....	23
1.2.1. Possíveis Lesões na Estrutura do DNA	23
1.2.2. O Reparo de Danos no DNA	23
1.2.3. A Coordenação entre Sinalização do Dano no DNA e Progressão do Ciclo Celular.....	29
1.3. O COMPLEXO 9-1-1	31
1.3.1. Estrutura do Complexo 9-1-1.....	31
1.3.2. Sobreposição de das Vias de Sinalização de Danos, Replicação e Reparo de DNA.....	33
1.4. Detecção e Reparo de Danos no DNA em <i>Leishmania</i>	34
MATERIAL E MÉTODOS	36
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1. ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA.....	37
2.2. CULTIVO E TRANSFEÇÃO DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. MAJOR</i>	37
2.3. CONTAGEM DOS PARASITAS E CURVAS DE CRESCIMENTO.....	38
2.4. PCR, DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E REAÇÃO DE LIGAÇÃO.....	38
2.5. EXTRAÇÃO DE PLASMÍDEO E DNA GENÔMICO.....	38
2.6. OBTENÇÃO DAS CONSTRUÇÕES pGEXGSTLMHUS1, pET28a6XHisLMRAD9 e pXG1LMRAD9	39
2.7. ANTICORPOS	39
2.8. PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS ELETROCOMPETENTES E ELETROPORAÇÃO.....	40
2.9. SDS-PAGE.....	41
2.10. OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE PROTEÍNAS TOTAIS DE <i>L. MAJOR</i>	41
2.11. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGA E OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE PROTEÍNAS DE <i>E. COLI</i>	42
2.12. OBTENÇÃO DE SONDAS PARA AS ANÁLISES DE <i>SOUTHERN BLOTTING</i> E <i>NORTHERN BLOTTING</i>	42
2.13. ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE	43
2.14. IMUNOPRECIPITAÇÃO.....	43
2.15. <i>ChIP</i> (CHROMATIN IMUNOPRECIPITATION)	44
2.16. OBTENÇÃO DE RNA TOTAL.....	45
2.17. <i>NORTHERN BLOTTING</i>	45
2.18. <i>SOUTHERN BLOTTING</i>	46
2.19. <i>WESTERN BLOTTING</i>	46
2.20. IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	47
2.21. FRACIONAMENTO CELULAR E ISOLAMENTO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À CROMATINA	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
3.1. A ORF LmjF23.0290 CODIFICA UMA PROTEÍNA POSSIVELMENTE HOMÓLOGA DE HUS1	50
3.1.1. Análise da Estrutura de Lm331	50
3.1.2. Análise Filogenética de Lm331	52
3.2. LMHUS1 LOCALIZA-SE NO NÚCLEO DE <i>L. MAJOR</i>	54
3.2.1. Expressão Heteróloga de LmHus1 e Produção de Anticorpos Anti-LmHus1	54
3.2.2. Análise da Localização Subcelular de LmHus1	56
3.3. LMHUS1 RELOCA-SE E ASSOCIA-SE À CROMATINA EM RESPOSTA AO ESTRESSE GENOTÓXICO	57

3.3.1.	<i>Análise da Distribuição Nuclear de LmHus1 em Reposta ao Estresse Genotóxico</i>	57
3.3.2.	<i>Análise da Associação de LmHus1 com a Cromatina</i>	58
3.4.	GERAÇÃO DE LINHAGEM EXPRESSANDO NÍVEIS REDUZIDOS DE LMHUS1	61
3.5.	A LINHAGEM LMHUS1+/- APRESENTA DEFEITO DE CRESCIMENTO	63
3.6.	LMHUS1 ASSOCIA-SE COM SEQUÊNCIAS TELOMÉRICAS E A REDUÇÃO DOS SEUS NÍVEIS CAUSA ENCURTAMENTO DE TELÔMEROS	64
3.6.1.	<i>Análise de Fragmentos de DNA Contendo Repetições Teloméricas</i>	64
3.6.2.	<i>Análise da Associação de LmHus1 com Sequências Teloméricas em L. major</i>	68
3.7.	A REDUÇÃO NOS NÍVEIS DE LMHUS1 COMPROMETE A RESPOSTA CELULAR AO ESTRESSE GENOTÓXICO	69
3.8.	LMHUS1 CO-LOCALIZA-SE COM LMRPA1	72
3.8.1.	<i>Identificação de Proteína Homóloga de Rpa1 em L. major</i>	72
3.8.2.	<i>Análise da Localização de LmRpa1 em L. major</i>	74
3.8.3.	<i>Análise da Associação de LmRpa1 com a Cromatina</i>	75
3.8.4.	<i>Análise da Co-localização entre LmHus1 e LmRpa1</i>	75
3.8.5.	<i>Análise da Interação entre LmHus1 e LmRpa1</i>	76
3.9.	A ORF LMJF.15.0980 CODIFICA UMA PROTEÍNA HOMÓLOGA A RAD9	78
3.9.1.	<i>Busca por Possíveis Homólogos de Rad1 no Genoma de L. major</i>	78
3.9.2.	<i>Análise da Estrutura de Lm718</i>	78
3.9.3.	<i>Análise Filogenética de Lm718</i>	81
3.10.	LMRAD9 LOCALIZA-SE NO NÚCLEO DE L. MAJOR	83
3.10.1.	<i>Expressão Heteróloga de LmRad9 e Produção de Anticorpos Anti-LmRad9</i>	83
3.10.2.	<i>Análise da Localização Subcelular de LmRad9</i>	84
3.11.	LINHAGEM DE CÉLULAS QUE SUPEREXPRESSAM LMRAD9 APRESENTA DEFEITO DE CRESCIMENTO	86
3.12.	LINHAGEM DE CÉLULAS QUE SUPEREXPRESSA LMRAD9 APRESENTA SENSIBILIDADE AUMENTADA AO MMS	88
3.13.	LMRAD9 INTERAGE COM LMHUS1 <i>IN VIVO</i>	90
3.13.1.	<i>Análise da Conservação dos Resíduos de Interação entre LmHus1 e LmRad9</i>	90
3.13.2.	<i>Análise da Interação entre LmHus1 e LmRad9</i>	92
3.14.	LMRAD9 CO-LOCALIZA-SE COM LMRPA1	93
3.15.	A REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE LMHUS1 COMPROMETE A ASSOCIAÇÃO DE LMRPA1 COM A CROMATINA	94
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
4.1.	CONCLUSÕES	102
5.	APÊNDICES	103
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. A *Leishmania* e Leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, dentre as doenças causadas por protozoários, as leishmanioses ocupam o segundo lugar na classificação de magnitude de danos para a saúde pública. Atualmente, cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco e 12 milhões estão acometidas pela doença ao redor do mundo (Figura 1). Entre os países endêmicos para leishmanioses, o Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão respondem por 90% dos casos de leishmaniose visceral.

Figura 1. Distribuição Geográfica das Leishmanioses. As áreas em amarelo no mapa indicam regiões endêmicas para leishmaniose. Este dado representa a somatória aproximada dos casos de leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea. Dados originais: WHO (<http://www.who.int/en/>).

O ciclo de vida das leishmanias se estabelece entre um hospedeiro vertebrado e flebotomíneos, insetos da ordem *Díptera*. O ciclo envolve duas formas do parasita: uma alongada e dotada de flagelo, a promastigota, e outra arredondada com flagelo não desenvolvido, a amastigota (Figura 2). Durante a ingestão de sangue por fêmeas de flebotomíneos infectadas, formas promastigotas metacíclicas são inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado. Células fagocíticas do sistema imunológico, como macrófagos, internalizam o parasita inoculado e, no ambiente intracelular, as formas metacíclicas se diferenciam em amastigotas. A multiplicação das formas amastigotas

Figura 2. Principais Formas Evolutivas Durante o Ciclo de Vida da *Leishmania*. Representação esquemática das principais organelas celulares encontradas nas formas promastigota (esquerda) e amastigota (direita) de *Leishmania*. A porção anterior das duas formas é considerada aquela contendo a bolsa flagelar. Esta figura foi gerada a partir de figura previamente publicada (Besteiro, Williams et al. 2007).

causa o rompimento dos macrófagos e a fagocitose dos amastigotas liberados por novos macrófagos, culminando em inflamação local. Se o inseto realizar seu repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado previamente infectado, macrófagos que albergam amastigotas serão ingeridos pelo mesmo. No trato digestivo do inseto, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas e depois em promastigotas metacíclicas. Após migrar para o aparelho bucal do inseto, as formas metacíclicas poderão ser inoculadas no próximo hospedeiro vertebrado (Figura 3) (Kaye and Scott (2011).

Figura 3. Ciclo Infeccioso das Leishmanioses. Canídeos e roedores são os hospedeiros reservatório da maioria das espécies de *Leishmania* e a partir deles o parasita é transmitido para humanos. O ciclo infeccioso pode ser didaticamente dividido em dois estágios: um dependente do inseto transmissor e outro dependente do mamífero hospedeiro. No inseto, ocorre a diferenciação do parasita em formas promastigotas metacíclicas infectantes. No mamífero, o parasita diferencia-se em amastigotas, multiplica-se e pode ser novamente ingerido por insetos transmissores. Esta figura foi modificada a partir de figura previamente publicada (Kaye and Scott 2011).

As diversas manifestações clínicas das leishmanioses, listadas na Tabela 1, demonstram a complexidade da interação das espécies de leishmanias com seus hospedeiros. As espécies do subgênero *Leishmania*, como *Leishmania major*, colonizam as regiões anterior e posterior do estômago do inseto e estão associadas às formas tegumentar e visceral da doença no hospedeiro vertebrado. Em contrapartida, as espécies do subgênero *Viannia*, como *Leishmania braziliensis*, colonizam as regiões do piloro e ílio, e podem ocasionar o desenvolvimento das formas tegumentares da leishmaniose. Este fato revela que as diferenças nas manifestações clínicas das leishmanioses podem ser uma consequência da expressão gênica diferencial entre estas espécies, pois não há diferenças significativas na estrutura do genoma e conjunto de genes entre elas que suportem tal distinção fenotípica (Peacock, Seeger et al. 2007). Também, a habilidade de sobreviver em ambientes tão díspares durante o ciclo de vida, denota a grande capacidade de adaptação destes parasitas, possivelmente por intermédio de mecanismos peculiares de controle da expressão gênica.

Tabela1. Manifestações Clínicas das Leishmanioses

Tipo	Sintomas
Leishmaniose Cutânea	Lesões de pele nas regiões da face, braços e pernas. Geralmente, o processo de cura é espontâneo, mas esta infecção pode gerar incapacidade física e resultar em cicatrizes permanentes. Depois da recuperação, o paciente desenvolve imunidade contra reinfecção por espécies de <i>Leishmania</i> que causam esta forma da doença.
Leishmaniose Cutânea Difusa	Difícil de tratar devido ao caráter difuso das lesões, que assemelham-se a lepra e não se curam espontaneamente. Esta manifestação de leishmaniose está especialmente relacionada com indivíduos imunossuprimidos. É frequente a reincidência após o tratamento.
Leishmaniose Mucocutânea	É também conhecida como espongiose na América do Sul e causa lesões profundas na região do rosto. Ela destrói as membranas mucosas do nariz, boca e garganta. Cirurgia de reconstrução facial é geralmente necessária durante o tratamento.
Leishmaniose Visceral	É também conhecida como 'Kala azar'. Caracteriza-se por febre irregular, perda de peso, dilatação do fígado e baço e anemia. É a forma mais severa de leishmaniose e pode ser fatal se não tratada. O período de incubação varia de meses a anos e compromete órgãos internos. Após a recuperação, pacientes podem manifestar leishmaniose cutânea de forma crônica, que requer tratamento prolongado e de alto custo.

Tabela modificada a partir de tabela fornecida no site de WHO (<http://www.who.int/en/>)

1.1.1. A Regulação da Expressão de Genes em *Leishmania*: O Papel da Amplificação Gênica

Em *Leishmania*, grupos de genes são co-transcritos em um único RNA policistrônico. Os RNAs maduros correspondentes a cada gene individual são gerados através de *trans-splicing* entre a sua extremidade 5' e um fragmento de RNA, denominado RNA SL (*spliced leader*). Via de regra, este evento é acoplado ao processo de poliadenilação, que ocorre na extremidade 3' de cada transcrito (LeBowitz, Smith et al. 1993). Neste cenário, o controle da expressão dos genes neste organismo deve ocorrer majoritariamente após a transcrição, em processos envolvendo, por exemplo, as

regiões não traduzidas dos RNAs maduros (David, Gabdank et al. 2010). Além do controle pós transcricional, modificações epigenéticas também parecem desempenhar um papel na modelagem da estrutura da cromatina e, portanto, no controle da expressão gênica nos tripanossomatídeos (Thomas, Green et al. 2009).

Outro evento biológico que afeta a expressão de genes e também a capacidade de adaptação de *Leishmania* é a amplificação gênica. Em células de mamíferos, eventos de amplificação gênica são normalmente associados à instabilidade genômica. Neste fenômeno, ocorre o aumento do número de cópias de genes devido à geração de moléculas circulares ou lineares de DNA extracromossomais (Beverley 1991). Em células que apresentam instabilidade genômica, como células neoplásicas, por exemplo, os eventos de amplificação gênica são frequentemente detectados (Slamon, Clark et al. 1987). Isto é consistente com o mecanismo proposto para geração de amplificação gênica (Figura 4). O início da amplificação depende da existência de estruturas de DNA que são caracteristicamente DNA lesionado, tais como quebra da dupla fita do DNA e DNA na forma de fita simples (McClintock 1941, Grondin, Roy et al. 1996). Desta forma, é concebível que a ocorrência de eventos de amplificação gênica pressuponha a capacidade de tolerar estruturas de DNA danificado, ainda que transitoriamente.

Em algumas espécies de *Leishmania*, a amplificação gênica parece ser explorada como um recurso para aumentar o número de cópias de genes de forma transitória (Figura 5), tornando-se determinante na regulação da expressão gênica. É notável, por exemplo, que níveis de RNA de genes contidos em segmentos de DNA extracromossomais são geralmente aumentados (Leprohon, Legare et al. 2009) e isto pode ser devido também a diferenças de padrão epigenético entre episomos e cromossomos (Hitchcock, Thomas et al. 2007).

Em *Leishmania*, os eventos de amplificação mais bem estudados são aqueles que envolvem as regiões R e H do genoma de *L. major* (Beverley 1991). Nos casos melhor estudados, os eventos de amplificação gênica estão associados a mecanismos de resistência a drogas. Além das implicações que este fato tem sobre o tratamento das leishmanioses, isso também tem profundo impacto na manipulação genética deste parasita em linhagens cultivadas em laboratório. Na Figura 4A está representada a análise de cariótipo de linhagens do parasito, contendo uma marca de seleção integrada no genoma. Após o cultivo desta linhagem em concentrações crescentes da droga de seleção, um evento de amplificação foi detectado na forma de

Figura 4. Possível Modelo para Amplificação Gênica em Eucariotos. (A) Amplificação gênica pode ser iniciada por quebras nos cromossomos (indicadas por asteriscos). O reparo destas quebras e o processo de replicação podem resultar na formação de cromossomos com dois centrômeros. Durante a mitose, a tensão física gerada durante a segregação dos cromossomos pode resultar em mais quebras e originar núcleos com cromossomos contendo regiões parcialmente deletadas ou duplicadas. Subsequentes ciclos de duplicação e quebras podem resultar no surgimento de arranjos de regiões do genoma organizadas na forma de tandem. (B) Como consequência de quebras cromossômicas, ampliações mais complexas podem acontecer. Na esquerda, está representado um processo de fusão de cromátides, seguida de quebra cromossômica, recombinação intracromossomal e desenvolvimento de amplificação extracromossomal circular. Outra possibilidade, representada à direita, é a aquisição de telômeros após um evento de quebra cromossomal. O cromossomo resultante pode ser substrato de recombinação através da homologia com segmentos duplicados gerando amplificação extracromossomal linear. Esta figura foi modificada a partir de figura previamente publicada (Tanaka and Yao 2009).

Figura 5. Evidências Experimentais da Plasticidade Genômica de *Leishmania*. (A) Cromossomos de duas linhagens de *L. major* separados por PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis – Eletroforese em Gel de Campo Pulsado). A seta na porção inferior do lado direito indica a existência de DNA amplificado em uma das linhagens analisadas. (B) Análise do número de cópias do cromossomo 5 de *Leishmania*. A análise foi conduzida através de FISH (Fluorescent In Situ Hybridization – Hibridação In Situ com sonda Fluorescente). Os pontos vermelhos indicam a localização do cromossomo 5 em cada célula analisada. No painel superior, há 3 cópias do cromossomo 5 em uma das células, enquanto que na outra apenas duas cópias são detectadas. No painel inferior, duas cópias do cromossomo 5 são detectadas em uma das células e apenas uma cópia na outra. Cada par de células representado provém de uma mesma população de uma mesma linhagem. O DNA do cinetoplasto (*k*) e nuclear (*n*) está corado em azul. Esta figura foi gerada a partir de dados previamente publicados (Squina, Pedrosa et al. 2007, Sterkers, Lachaud et al. 2012).

uma molécula de DNA extracromossomal. Fica evidente que a amplificação gênica é explorada como mecanismo de adaptação neste organismo. Desta forma, esse fenômeno, assim como seus mecanismos moleculares, deve ser determinante para a plasticidade genômica que é observada neste parasita.

Apesar da relevância da amplificação gênica para a biologia dos tripanossomatídeos, nada se sabe sobre as maquinarias envolvidas neste processo e tampouco sobre a sua regulação. O impacto das leishmanioses na saúde pública por si só justifica o seu estudo. Mas, além disto, o estudo dos tripanossomatídeos de um modo geral pode oferecer uma compreensão melhor da evolução dos eucariotos e dos processos moleculares relacionados à manutenção da estabilidade genômica.

1.2. Estabilidade Genômica: Detecção e Reparo de Danos no DNA

1.2.1. Possíveis Lesões na Estrutura do DNA

A estabilidade de um genoma é constantemente desafiada por danos causados na estrutura primária do DNA por diversos fatores que incluem desde metabólitos celulares até agentes externos. Como consequência, podem ocorrer mutações de um único nucleotídeo ou até alterações mais complexas como fusões de cromossomos, deleções ou translocações de regiões do genoma e aneuploidia. Exemplos de eventos ou estruturas relacionados à existência de DNA danificado na célula estão apresentados na Figura 6 e podem ser didaticamente agrupados em: *i*) Regiões do DNA com estrutura diferente da dupla hélice, geradas durante eventos de processamento do DNA (como as estruturas de Holiday) e especialmente pelo colapso de forquilhas de replicação. *ii*) Modificações nas bases nitrogenadas, tais como metilação, oxidação ou redução, causadas por radiação ultravioleta, radiação ionizante, espécies reativas de oxigênio ou agentes químicos alquilantes. *iii*) Modificações da estrutura do DNA causadas pela perda espontânea de bases nitrogenadas e quebra de uma ou das duas fitas da dupla hélice por radiação ionizante ou como resultado do reparo de bases danificadas e recombinação. *iv*) Ligações covalentes entre as cadeias individuais da dupla hélice ou entre o DNA e proteínas, causadas por agentes como cisplatina e aldeídos.

1.2.2. O Reparo de Danos no DNA

Um conjunto de mecanismos especializados em reconhecer e reparar as aberrações estruturais no DNA foi selecionado durante a evolução dos seres vivos para escapar dos efeitos deletérios decorrentes das alterações no material genético (Harrison and Haber 2006, Harper and Elledge 2007). Células defeituosas para estes mecanismos apresentam maior sensibilidade a agentes genotóxicos e, em mamíferos, podem originar doenças como o câncer. Cada tipo de lesão no DNA pode desencadear uma resposta distinta (Figura 6). Algumas destas lesões podem ser reparadas em uma única reação enzimática, como no reparo dos dímeros de pirimidina pela Fotoliase de *E. coli* (Malhotra, Kim et al. 1994). Por outro lado, durante o reparo de outras lesões, como de ligações covalentes entre as fitas da dupla hélice do DNA, podem ser gerados.

Tipo de Dano		Via de Reparo
Estresse Replicativo	Trechos de DNA Fita Simples	Quinase Relacionada a Ataxia-telangiectasia e Rad3 (ATR). ATR-ATRIP, CHK1, RPA, PCNA, Rad17/RFC2-5, Complexo 9-1-1 (Rad9, Rad1 e Hus1), Polδ/ε, FEN1, Lig1.

Quebra da Fita Dupla de DNA		Recombinação Homóloga e Junção de Extremidades Não Homólogas . ATM, Complexo MNR (Mre11, Nbs1 e Rad50), Rad52, Rad51, BRCA1, BRCA2, MMS4, MUS81, KU70, KU80, DNA-PKcs, XRCC4, Ligase IV

O ⁶ MeGua	Dímero de Timina	Reparo por Excisão de Bases (Base Excision Repair – BER) OGG1, NEIL, PNKP, β-liase, APE1, Polβ, XRCC1, Lig3, RFC, PCNA, Polβ, Polδ/ε, FEN1, Lig1, Polη, Complexo 9-1-1 (Rad9, Rad1 e Hus1), PARP1, TDP1.

Erros de Incorporação de Nucleotídeos Durante Replicação do DNA	Ligação Covalente entre Nucleotídeos de Fitas Opostas	Reparo por Excisão de Nucleotídeos (Nucleotide Excision Repair – NER) e Reparo de Mal-Pareamento (Mismatch Repair) CSA, CSB, Rad23B, XPA, RPA, XPC, XPD, TFIIH, XPG, XPF-ERCC1, Polδ/ε, Lig3, RFC, PCNA, MSH2, MSH3, MSH6, PMS2, MLH1, MLH3, Endonuclease1, FEN1

Figure 6. Estrutura de Possíveis Lesões no DNA e Respectivas Proteínas Envolvidas no Reparo. As representações de possíveis lesões na estrutura do DNA estão agrupadas em linhas, de acordo com a similaridade dos danos e das vias de reparo que ativam. **O⁶MeGua**: O⁶-metildeoxiguanosina. **ATM**: Ataxia-Telangiectasia Mutated (Proteína Mutada na Doença de Ataxia-Telangiectasia). **ATRIP**: ATR Interacting Protein (Proteína que Interage com ATR). **CHK1** e **CHK2**: Checkpoint Kinase 1 e 2

intermediários cujas estruturas constituem DNA danificado e por isto uma sequência de eventos mediados por várias proteínas faz-se necessária para a finalização do processo.

Para fins ilustrativos, é possível organizar as diversas respostas ao dano no DNA dentro de um modelo geral (Figura 7 e Tabela 2). Neste modelo, a resposta é desencadeada por proteínas sensoras especializadas no reconhecimento específico de cada tipo de lesão. A detecção do dano é então sinalizada por proteínas mediadoras, através de interação física ou funcional com proteínas envolvidas em vias de transdução de sinais. A partir daí, proteínas efetoras executam a resposta, que pode incluir modificação da cromatina (Wang, Han et al. 2012), expressão de genes envolvidos no reparo de DNA (Yousefzadeh and Wood 2013), parada do ciclo celular (Grandin and Charbonneau 2013) ou até a morte celular (Huang, Zhang et al. 2012).

O reparo do mal pareamento entre bases é realizado por uma enzima nuclease que cliva uma das fitas de DNA para remoção da base causadora da distorção estrutural. A base correta para o pareamento é adicionada através de enzimas com atividade de polimerase e de ligase de DNA (Jiricny 2006). Outras lesões, tais como oxidação de bases e ligações covalentes entre as cadeias da dupla fita do DNA, são processados pela via de excisão de bases (*base excision repair* – BER). Nesta via,

Continuação. Figure 6. Estrutura de Possíveis Lesões no DNA e Respectivas Proteínas Envolvidas no Reparo. (Quinase Sensora 1 e 2). **RPA**: Replication Protein A (Proteína da Replicação A). **PCNA**: Proliferating Cell Nuclear Antigen (Antígeno de Proliferação Celular). **RFC2-5**: Replication Factor C, subunits 2-5 (Subunidades 2-5 do Fator de Replicação C). **FEN1**: Flap Endonuclease 1. **Lig1, Lig3**: Ligase 1 e Ligase 3. **BRCA1 e BRCA2**: Breast Cancer Protein 1 and 2 (Proteínas de Câncer de Mama 1 e 2). **DNA-PKc**: DNA Dependent Protein Kinase (Proteína Quinase Dependente de DNA). **XRCC1, XRCC4**: X-Ray Repair Complementing Defective Repair in Chinese Hamster Cells Protein (Proteína Defectiva para Complementar o Reparo de Raios-X em Hamster Chinês). **OGG1**: 8-Oxoguanine glicosilase. **NEIL**: Endonuclease VIII-Like Protein (Proteína Similar a Endonuclease VIII). **PNKP**: Polynucleotide Kinase Phosphatase (Fosfatase Polinucleotídeo Quinase). **APE1**: Apurinic/Apirimidic Endonuclease (Endonuclease de Sítios Apurínicos e Apirimídicos). **PARP1**: Poli(ADP-Ribose) Polimerase. **TDPI**: Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 (Fosfodiesterase 1 de DNA dependente de Tirosina). **CSA e CSB**: Cockayne Syndrome WD Repeat Protein A or B (Proteína A da Síndrome de Cockayne – ou Proteína B- Contendo Repetições WD,). **XPA, XPC, XPD, XPF e XPG**: Proteína A/C/D/F/G da Xeroderma Pigmentosa. **TFIID**: Transcription Factor II H (Fator de Transcrição II H). **MSH2, MSH3 e MSH6**: Mismatch Repair Recognition Enzyme 2/3/6 (Enzima Reconhedora de Mal-Pareamento). **PMS2, MLH1 e MLH3**: Proteínas Homólogas de MSH. Esta figura foi produzida com base em figura previamente publicada (Sancar, Lindsey-Boltz et al. 2004). A lista de proteínas envolvidas em cada tipo de dano foi elaborada com base nas revisões (Jackson and Bartek 2009, Curtin 2012).

ocorre a glicosilação e hidrólise da ligação covalente entre a base danificada e a pentose e o reparo é finalizado por polimerases e ligases de DNA (David, O'Shea et al. 2007). Outro mecanismo de reparo de bases danificadas envolve a via de excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair* – NER). Nesta via, ocorre a remoção de um trecho de 22 a 30 nucleotídeos na cadeia de DNA contendo a base danificada, gerando uma região de fita simples de DNA, que é finalmente preenchida por DNA polimerases e ligases de DNA (Hoeijmakers 2001). Há também exemplos notáveis de lesões causadas por radiação ultravioleta que não são reparadas. Existem DNA polimerases, tais como a Pol η que ignoram tais lesões, pois sintetizam DNA em condições menos restritivas de pareamento de bases, em um processo conhecido como *síntese translesão* (Loeb and Monnat 2008).

Figura 7. Modelo de Reconhecimento e Resposta Celular aos Danos de DNA. Lesões na estrutura do DNA como aquelas exemplificadas na Figura 6, podem acarretar no colapso da forquilha de replicação. As estruturas resultantes destes eventos são reconhecidas por proteínas sensoras e iniciadoras de resposta ao dano. A resposta ao dano inclui o recrutamento de proteínas mediadoras, que por sua vez ativam proteínas transdutoras e efetoras para gerar uma resposta celular (uma lista classificatória destas proteínas está apresentada na Tabela 1). Possíveis eventos que ocorrem em resposta a danos no DNA estão representados na porção inferior da figura. Parte desta figura foi retirada de (Curtin 2012).

Tabela 2. Nomenclatura e Abreviações de Proteínas Sensores de Dano de DNA da Via de ATR

<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>H. Sapiens</i>	Modo de Atuação na Resposta ao Dano de DNA
Rpa1	Rpa1	Rpa1	Iniciador (Associação Física Direta com a região de DNA danificado)
Rpa2	Rpa2	Rpa2	
Rad24	Rad17	Rad17	
Rad17	Rad1	Rad1	Sensor (Associa-se com os Iniciadores na Região Danificada)
Mec3	Hus1	Hus1	
Ddc1	Rad9	Rad9	
Dpb11	Cut5/Rad4	TopBP1	
Pol2	Cdc20	Pol2	
Rad9	Crb2	53BP1 MDC1	Mediador (Recrutam Proteínas de Reparo e Sinalização de Dano para a Região Danificada)
Mrc1	Mrc1	Claspina	
Mec1	Rad3	ATR	Transdutor (Promovem Modificações Pós-Traducionais em Proteínas que Atuam na Resposta ao Dano no DNA)
Ddc2	Rad26	ATRIP	
Tel1	Tel1	ATM	
Rad53	Cds1	CHK2	Efetor (Fosforilam Proteínas Diretamente Envolvidas no Controle do Ciclo Celular)
CHK1	CHK1	CHK1	

Tabela modificada a partir de publicação prévia (Navidgi-Patil et al. 2009. *DNA Repair*, 8, 993-1003).

O reparo de quebras das duas fitas do DNA é realizado através de dois mecanismos principais: a junção de extremidades não homólogas (*non homologous end joining* - NHEJ) (Lieber 2008) e a recombinação homóloga (*homologous recombination* - HR) (San Filippo, Sung et al. 2008). NHEJ é a forma mais propensa a erros, pois envolve o reconhecimento e junção das extremidades da dupla fita do DNA, sem pareamento de bases. Este processo é realizado pela ação das proteínas Ku, ativação e recrutamento de DNA-PKcs, DNA polimerases e DNA ligases. A HR utiliza sequências de DNA de cromátides irmãs como modelo para mediar o reparo fiel da lesão. O reparo por HR é iniciado pelo processamento da extremidade da dupla fita em um trecho contendo DNA na forma de fita simples através da ação do complexo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1). O reparo de forquilha de replicação paralisadas e de ligações covalentes entre as cadeias da dupla fita também envolvem HR (Kennedy and D'Andrea 2005).

Figura 8. Modelo do Controle do Ciclo Celular de Células Eucarióticas em Função de Danos no DNA. *DSB* (Double Strand Break - Quebra da Fita Dupla de DNA) e *SSB* (Single Strand Break – Quebra de Uma Única Fita do DNA) são reconhecidas pelas quinases ATM e ATR, respectivamente. O recrutamento de ATM por DSB acarreta em ativação de CHK2 e p53 e consequente parada do ciclo celular em G1. Recrutamento de ATR por SSB acarreta em ativação de CHK1 e consequente parada do ciclo celular durante a Fase S ou G2. *CDC25*: Cell Division Cycle 25 Phosphatase (Fosfatase 25 do Ciclo de Divisão Celular). *CDK*: Cyclin-Dependent Kinase (Quinase Dependente de Ciclina). *S*: Fase do ciclo celular em que ocorre a síntese de DNA. *M*: Fase do ciclo celular em que ocorre a mitose. Linhas tracejadas indicam alvos secundários e representam redundância parcial entre as vias de resposta a DSB e SSB. Esta figura foi modificada a partir de figura previamente publicada (Curtin 2012).

1.2.3. A Coordenação entre Sinalização do Dano no DNA e Progressão do Ciclo Celular

Para o estabelecimento de uma resposta apropriada aos danos no DNA é necessário que o controle da progressão do ciclo celular esteja acoplado às vias de detecção e reparo de DNA. Desta forma, é possível garantir que as lesões no DNA sejam reparadas antes que se tornem mutações permanentes e herdáveis durante a mitose. As proteínas quinases *Ataxia-Telangiectasia Mutated* (ATM) e *Ataxia-Telangiectasia Mutated and Rad3-related* (ATR) têm papéis cruciais na coordenação entre a detecção e o reparo de danos no DNA e a progressão do ciclo celular (Figura 8). As quebras da dupla fita do DNA ativam primordialmente ATM e a proteína quinase *checkpoint* Chk2. A ativação destas quinases é requerida para a ativação de p53, que inibe as Ciclinas D e E e paralisa o ciclo celular na fase G1. Estruturas de DNA na forma de fita simples ativam a quinase ATR, que fosforila a proteína quinase *checkpoint* Chk1. ATR interage ainda com o complexo MRN para promover a HR no processo de reparo de forquilhas de replicação colapsadas. ATR e Chk1 desencadeia a inibição de ciclinas, tais como Ciclina A, e paralisa o ciclo celular na fase S ou G2. O reparo das forquilhas de replicação via HR, também depende da fosforilação de BRCA2 e Rad51 por ATR e Chk1 e diversos tipos de câncer estão associados com mutações nestas quinases (Curtin 2012).

A associação do complexo RPA (*replication protein A*) com as regiões de DNA na forma de fita simples é essencial para o recrutamento de ATR para estas lesões (Figura 9) (Zou and Elledge 2003). Estes segmentos de DNA recobertos por RPA servem também como sítios para associação do complexo 9-1-1 formado pelas proteínas Rad9, Hus1 e Rad1. O complexo 9-1-1 em conjunto com Rad17 (Bermudez, Lindsey-Boltz et al. 2003) estabiliza a permanência de ATR no sítio da lesão e garante a fosforilação de Chk1 até que o dano seja efetivamente sinalizado (Medhurst, Warmerdam et al. 2008). O complexo 9-1-1 facilita o recrutamento e ativação de ATR nos sítios de lesão no DNA através da interação com TopBP1 (Delacroix, Wagner et al. 2007). A relevância funcional deste conjunto de interações pode ser demonstrada pelo comprometimento da fosforilação de Chk1 e, portanto da parada do ciclo celular, quando os componentes do complexo 9-1-1 são deletados (Melo and Toczyski 2002). Dessa forma, o complexo 9-1-1 é um componente central na coordenação entre detecção de danos no DNA e progressão da divisão celular.

Figura 9. Modelo de Reconhecimento e Sinalização de Fita Simples de DNA. (1) Trechos de fita simples de DNA são recobertos por RPA. (2) Rad17-RFC2-5 e ATR são recrutados para o sítio da lesão. O complexo 9-1-1 (destacado em rosa) é recrutado e, através de interação com TopBP1, reforça a permanência de ATR no sítio de lesão. (3) ATR fosforila Rad17 e Claspin. A fosforilação de Claspin serve para o recrutamento de Chk1. (4) A fosforilação de Rad17 estimula a permanência do complexo 9-1-1, reforçando a permanência de ATR no local da lesão que por sua vez fosforila Chk1. Desta forma, a fosforilação de Chk1 é mantida, garantindo que a progressão do ciclo celular seja pausado, até que a região de DNA danificado seja reparada. Esta figura foi modificada a partir de figura previamente publicada (Medhurst, Warmerdam et al. 2008)

1.3. O Complexo 9-1-1

1.3.1. Estrutura do Complexo 9-1-1

A estrutura do complexo 9-1-1 foi recentemente determinada por estudos de cristalografia (Dore, Kilkenny et al. 2009) e confirmaram os indícios de alta similaridade deste complexo com a estrutura em forma de *grampo deslizante* do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), que atua nos processos de replicação do DNA. A arquitetura de complexos proteicos como este, pode ser representada como um anel que circunda o DNA e o acomoda no canal interno de sua estrutura. Os complexos triméricos com esta estrutura de grampo, e envolvidos na replicação do DNA, estão presentes não apenas em eucariotos superiores, mas também em vírus, bactérias e *archaea* (Indiani and O'Donnell 2006), onde não existem homólogos conhecidos de trímeros envolvidos na sinalização de dano no DNA. A vasta distribuição destes trímeros pelos reinos da vida sugere que a evolução dos processos de sinalização de danos no DNA possa ser oriunda de um trímero ancestral que desempenhava a função de replicação (Dionne, Nookala et al. 2003). Análises filogenéticas sugerem que ocorreram dois processos evolutivos distintos que deram origem aos grampos heterotriméricos: um deles resultou na formação do heterotrímero de PCNA em *archaea* e o outro no complexo heterotrimérico 9-1-1 em eucariotos superiores (Figura 13)

Apesar da notável semelhança estrutural entre o complexo 9-1-1 e PCNA, diferenças importantes também foram observadas. A estrutura do complexo heterotrimérico 9-1-1 envolve a interação de Rad9, Hus1 e Rad1, nesta ordem, através de seus domínios amino e carboxi terminal (Figura 10 e Apêndice A). A estrutura do PCNA de eucariotos envolve três moléculas de uma mesma proteína e, portanto representa um homotrímero, com simetria tripla quase perfeita. Acredita-se que a diferença quanto à simetria entre o complexo 9-1-1 e PCNA seja determinante para a distinção de função entre eles. A estrutura simétrica do complexo PCNA garante uma distribuição de cargas mais homogênea entre suas subunidades, em comparação com a distribuição marcadamente desigual entre as subunidades do complexo 9-1-1. Neste último, há uma forte predominância de cargas positivas na superfície interna do anel. Outra diferença entre estes dois complexos diz respeito às alças das alfa hélices H2 de Rad1 e H3 de Rad9. Estas estruturas formam protuberâncias no canal interno da estrutura do complexo 9-1-1 que certamente determinam sua capacidade de ligação com o DNA.

Figura 10. Comparação entre o Complexo 9-1-1 e PCNA. (A) Representação do cristal do complexo 9-1-1 e PCNA. Na estrutura do complexo 9-1-1, cada subunidade é indicada por diferentes cores: Rad9, verde; Hus1, azul; Rad1, vermelho. As regiões circundadas pela linha rosa indicam o *IDC loop* (Inter Connecting Domain Loop – Laço de Interconexão entre Domínios) de cada subunidade. *H2* indica a alfa hélice 2 de Rad1 e *H3* indica a alfa hélice 3 de Rad9 que diferem das regiões correspondentes em PCNA. As letras *C* e *N* indicam a extremidade carboxílica e amina, respectivamente. Para visualizar as subunidades Hus1 e Rad9 separadamente, ver Figura 12 e Figura 23, respectivamente. A Rad9 do complexo 9-1-1 representado aqui é desprovida dos 120 aminoácidos de sua região amino terminal, pois com eles não é possível cristalizar o complexo (Dore, Kilkenny et al. 2009). Na estrutura do PCNA, as subunidades estão representadas em cores distintas, mas correspondem ao mesmo monômero. Esta estrutura do PCNA foi gerada em complexo com peptídeo da proteína p21WAF1/CIP1, representado na parte externa (azul, amarelo e rosa) do complexo. (B) Distribuição de carga na superfície do complexo 9-1-1 e de PCNA. Os traços indicam os limites de cada subunidade no contexto do complexo. Esta figura foi gerada a partir de figuras previamente publicadas (Madabushi & Lu: *The Novel Role of Cell Cycle Checkpoint Clamp Rad9-Hus1-Rad1 (The 9-1-1 Complex) in DNA Repair*) (Xu, Bai et al. 2009).

Outra consequência da assimetria observada no complexo 9-1-1 é a existência de três *IDC loops* (inter connecting domain loop – laço de interconexão entre domínios) distintos neste complexo. O *IDC loop* é a região através da qual o PCNA e o complexo 9-1-1 estabelecem interações com proteínas ligantes. Quando os três *IDC loops* são idênticos, tal como no PCNA, quaisquer subunidades do complexo se liga com a mesma afinidade com as proteínas parceiras. Entretanto, três *IDC loops* distintos possibilitam a ocorrência de interações preferenciais entre uma subunidade e uma proteína ligante. Dessa forma, tanto o modo de ação quanto a regulação do complexo 9-1-1 pode acontecer de forma bem diferente do que ocorre em um complexo homotrimérico. Outra diferença importante entre os dois complexos é a extensão não globular contendo 120 resíduos de aminoácidos na região carboxi terminal de Rad9 do complexo 9-1-1 de células de humanos. Esta região da proteína Rad9 contém sítios de fosforilação que são essenciais para regular a associação do complexo 9-1-1 com o DNA durante a detecção de danos (Furuya, Miyabe et al. 2010).

As investigações experimentais confirmam a relação entre as diferenças estruturais e a especialização funcional destes complexos no metabolismo de DNA. Em ensaios de associação com fragmentos de DNA lesionado, o complexo 9-1-1 é recrutado preferencialmente para a extremidade 5' da junção fita simples/fita dupla de DNA, ao passo que PCNA se associa preferencialmente com as extremidades 3' (Ellison and Stillman 2003). Dessa forma, as peculiaridades estruturais e bioquímicas entre complexo 9-1-1 e PCNA contribuem para a compartimentalização funcional entre as vias de replicação e reparo de DNA em eucariotos.

1.3.2. Sobreposição de das Vias de Sinalização de Danos, Replicação e Reparo de DNA.

O complexo 9-1-1 percorre a extensão do DNA como um grampo deslizante. Seu movimento é paralisado quando resíduos do canal interno fazem contato com a RPA que recobre algum trecho de fita simples de DNA. Ali, ele atua como uma plataforma para recrutar e ativar outras proteínas de resposta e sinalização ao dano no DNA (Figura 9). Por outro lado, o PCNA atua como um fator de processividade de DNA polimerases que catalisam a síntese de DNA durante a replicação. Para isto, ele se associa principalmente a Pol α e a Pol δ , que são fatores essenciais para a síntese de

DNA. Não obstante, a marcada distinção funcional entre estes dois complexos, seus papéis também podem apresentar sobreposição. Em *Schizosaccharomyces pombe*, o complexo 9-1-1 pode atuar como fator de processividade de DNA polimerases envolvidas na síntese translesão (Kai and Wang 2003). O tratamento com luz ultravioleta resulta em ubiquitinação de PCNA que, ao contrário da forma não ubiquitinada, interage com Pol η e atua como fator de processividade para a síntese translesão (Kannouche, Wing et al. 2004). Estas observações ilustram a interconexão funcional entre as maquinarias de replicação e reparo de DNA e sugere a existência de mecanismos de regulação muito bem coordenados entre as mesmas.

Há também um crescente número de evidências que indicam a existência de interação entre o complexo 9-1-1 e enzimas da via BER. Esta interação parece resultar em modulação positiva da atividade desta via (Helt, Wang et al. 2005). Particularmente, o complexo 9-1-1 parece estimular preferencialmente as proteínas que atuam nas etapas iniciais da via BER, tais como APE1 e POL β , em comparação com FEN1 e DNA ligase 1. Além disto, em células de mamíferos a depleção do complexo 9-1-1 resulta em fusões de cromossomos como consequência de disfunções dos telômeros. De forma consistente, a ruptura do complexo 9-1-1 é acompanhada pela redução da atividade da enzima telomerase em células de mamíferos (Francia, Weiss et al. 2006) e encurtamento dos cromossomos em leveduras (Khair, Chang et al. 2010). Isto sugere que o complexo de 9-1-1 atua como guardião da estabilidade genômica em eucariotos não somente como um sensor de danos no DNA, mas também como componente da maquinaria de síntese de DNA durante o reparo das lesões e também como regulador do funcionamento e proteção das extremidades cromossômicas.

1.4. Detecção e Reparo de Danos no DNA em *Leishmania*

Os protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* apresentam a plasticidade genômica como uma característica marcante. Como discutimos anteriormente, a plasticidade pode ter sido determinante para a configuração do genoma e biologia deste grupo de organismos. Apesar disso, os mecanismos de sinalização de danos no DNA permanecem amplamente desconhecidos nestes organismos quando comparado ao que sabemos sobre este assunto em eucariotos superiores.

A caracterização de algumas proteínas relacionadas ao metabolismo de DNA em tripanossomatídeos sugere que estes protozoários lidam com a manutenção do genoma de forma bastante peculiar. A replicação em *Trypanosoma cruzi* ocorre principalmente na periferia nuclear e é iniciada com a participação de uma proteína que funciona tanto como Orc1 como Cdc6 (Godoy, Nogueira-Junior et al. 2009). Em *Trypanosoma brucei*, os componentes do complexo de iniciação da replicação, ORC, é bastante divergente (Tiengwe, Marcello et al. 2012). Condizente com isso, a replicação em *Leishmania* também parece ser regida por processos regulatórios não convencionais, uma vez que o número de cópias de cromossomos pode variar entre diferentes isolados de uma mesma espécie (Figura 4B) (Sterkers, Lachaud et al. 2011).

Algumas proteínas homólogas daquelas envolvidas nas vias de BER, NHEJ, HR e síntese translesões em outros organismos foram identificadas em tripanossomatídeos (Passos-Silva, Rajao et al. 2010). O estudo dessas proteínas indica que estas vias de reparo de DNA foram conservadas nestes protozoários e, para além da manutenção da estabilidade genômica, estes mecanismos também são explorados no âmbito de sua plasticidade. Assim, a variação antigênica em *T. brucei* depende da recombinação homóloga para translocar os genes codificadores das VSGs entre diferentes regiões do genoma (Boothroyd, Dreesen et al. 2009). Entretanto, o entendimento dos mecanismos moleculares que regulam a sinalização dos danos no DNA ainda é muito limitado. Algumas observações experimentais, no entanto, sugerem que em *T. brucei* e *L. major* o remodelamento da cromatina é requerido para resposta ao estresse genotóxico (Nardelli, da Cunha et al. 2009, Glover and Horn 2012, Scher, Garcia et al. 2012).

A caracterização inicial da subunidade Hus1 do complexo 9-1-1 de *L. major* indica que esta proteína está envolvida nos eventos de resposta a lesões no DNA (Nunes, Damasceno et al. 2011). Com base nisso, é possível considerar que exista um complexo proteico homólogo ao complexo 9-1-1 em *Leishmania*. Dada à relevância deste complexo na manutenção da estabilidade genômica em eucariotos superiores, nós decidimos investigar a existência de um homólogo deste heterotrímero em *L. major*. O entendimento da composição, arquitetura, função e mecanismo de ação do homólogo do complexo 9-1-1 neste parasita pode contribuir para a compreensão das bases moleculares da sua plasticidade genômica.

Material e Métodos

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Análises de Bioinformática

As análises de BLAST, alinhamentos de sequências, detecção de domínios funcionais em proteínas, predição de estrutura proteica e relações filogenéticas foram realizadas com os programas ou servidores indicados nas legendas das figuras. Em todas estas análises, os parâmetros utilizados foram aqueles fornecidos automaticamente pelas ferramentas indicadas.

2.2. Cultivo e Transfecção de Formas Promastigotas de *L. major*.

A linhagem selvagem de *L. major* utilizada neste trabalho foi LT252, clone (MHOM/IR/84/LT252). Todas as demais linhagens (pXGHus1, pXGRad9, pXG e LmHus1+/-) foram derivadas desta linhagem selvagem. Estas linhagens foram cultivadas na forma promastigota em meio de cultivo M199 1X (Sigma-Aldrich), suplementado com HEPES 0,04M; adenina 0,1mM; biotina 50,0µg/ml; hemina 250,0µg/mL e soro fetal bovino 10,0%. O nome e a concentração da droga de seleção para as linhagens cujo cultivo requereu o seu uso, estão indicadas no texto principal. Todas as linhagens foram mantidas a 26°C em todos os experimentos.

As transfecções foram realizadas com promastigotas em fase exponencial de crescimento. As células foram lavadas duas vezes em tampão de eletroporação (HEPES 21mM; NaCl 137mM, KCl 5mM; Na₂HPO₄ 0,7mM e Glicose 6mM). As células foram suspensas em tampão de eletroporação na concentração de 10⁸ células /mL. 400µL desta suspensão juntamente com 5 - 50µg do plasmídeo a ser transfectado foram transferidos para uma cubeta de eletroporação com fenda de 2mm. O pulso elétrico foi aplicado com o aparelho *Gene Pulser XCellTM* (BioRad) calibrado com os seguintes parâmetros: 450V e 500µF. Após o pulso, as células foram mantidas por 12 h em 10mL de meio M199 1X sem droga. Após esse tempo de recuperação as células foram transferidas para placas de meio M199 1X semissólido (água nobre 1%), acrescido com a droga de seleção.

2.3. Contagem dos Parasitas e Curvas de Crescimento.

A densidade de parasitas em cultura, para todas as curvas de crescimento apresentadas neste trabalho, foi determinada através de contagem em câmara de Neubauer. A densidade em cada ponto de amostragem de um gráfico foi determinada com base em pelo menos duas contagens. Quando necessário, a cultura foi diluída para 1/10 da concentração inicial, com meio M199 1X, antes de serem contadas. Todos os gráficos foram gerados com o programa *Origin 6.0*.

2.4. PCR, Digestão com Enzimas de Restrição e Reação de Ligação.

As reações de PCR foram conduzidas com *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Thermo Scientific) utilizando o tampão fornecido pelo fabricante. As digestões de DNA com enzimas de restrição foram feitas com as enzimas indicadas nas figuras, adquiridas de *Thermo Scientific*, com os tampões e condições recomendadas pelo fabricante. As ligações para gerar as construções apresentadas neste trabalho foram realizadas a 16°C durante 20h em reações de 20µL, contendo 100ng de DNA (inserto mais vetor) e 5U de T4 DNA Ligase (Thermo Scientific).

2.5. Extração de Plasmídeo e DNA Genômico

Para extração dos plasmídeos analisados na Figura 14B, Figura 25B e Figura 26B, foi utilizado o sistema *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

Para extração do DNA genômico analisado na Figura 17B e Figura 19A, 10⁹ células foram coletadas por centrifugação e lavadas duas vezes com PBS 1X. A seguir, foram suspensas em 4mL de tampão Tris/EDTA (Tris 0,2M pH8,0; EDTA 10mM pH8,0). Proteinase K e SDS foram adicionados na concentração final de 50µg/mL e 0,5% (m/v), respectivamente. A suspensão foi mantida a 37°C durante 16h. O DNA foi purificado através de duas extrações com fenol, seguidas de duas extrações com clorofórmio. A seguir, etanol absoluto gelado foi adicionado para precipitar o DNA que foi coletado com auxílio de pinça de vidro. O material foi transferido para solução contendo RNase (Tris 10mM pH7,4; EDTA 1mM; RNase 10µg/mL) e estocado a 4°C.

2.6. Obtenção das Construções pGEXGSTLmHus1, pET28a6XHisLmRad9 e pXG1LmRad9

A ORF LmjF15.0980 (LmRad9) foi amplificada por PCR, a partir de DNA genômico de *L. major*, utilizando os *primers* LT212 (CCCGGGCATATGTCACTCCAATTACAGTG) e LT213 (CCCGGGCATATGTCAGTTCTGCGTCGGCCCTCG), que contêm sítios de restrição para *Sma*I e *Nde*I. Os produtos de PCR foram clonados no vetor pGEM para gerar a construção pGEMLmRad9. A partir desta construção a ORF foi retirada pela digestão com *Sma*I e clonada no vetor pXG1, previamente digerido com *Sma*I. A digestão de pGEMLmRad9 com *Nde*I foi realizada para clonar LmjF15.0980 no vetor pET28a previamente digerido com *Nde*I.

A ORF LmjF23.0290 (LmHus1) foi amplificada por PCR, a partir de DNA genômico de *L. major*, utilizando os *primers* L105 (GTTGTACAGTATGCGCTTCAAGG) e LT150 (GAAGATCTGTATGCGCTTCAAGGCGACC) que contêm sítios de restrição para *Bsr*GI e *Bgl*II. Os produtos de PCR foram clonados no vetor pGEM para gerar a construção pGEMLmHus1. A partir desta construção a ORF foi retirada pela digestão com *Bsr*GI e *Bgl*II e submetida à reação de *fill in* com enzima *Klenow*. O DNA resultante foi clonado no vetor pGEX2T, previamente digerido com *Bam*HI e submetido a reação de *fill in* com enzima *klenow*.

2.7. Anticorpos

Para a geração de anticorpos anti-LmHus1 em camundongo, extratos de bactéria, contendo a proteína GSTLmHus1 na forma insolúvel, foram submetidos a separação por eletroforese em SDS-PAGE. Após corar o gel com *Comassie Brilliant Blue R-250*, a banda de GSTLmHus1 foi extraída do gel, macerada com nitrogênio líquido, emulsionada com a *Adjuvant Emulsions* (Sigma) e injetada de forma subcutânea em camundongos.

Para geração de anticorpos anti-LmHus1 em coelho, o plasmídeo pGEMLmHus1 foi enviado para Raimundo R. Freire (*Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Canarias, Instituto de Tecnologías Biomédicas – Tenerife, Espanha*). A partir desta construção, a região carboxi terminal de LmHus1 foi clonada e expressa em pET28a. Este fragmento da proteína foi utilizado para imunizar coelhos e Raimundo R. Freire conduziu também a purificação destes anticorpos por afinidade.

Para geração de anticorpos anti-LmRad9 em camundongo, extratos de bactéria, contendo a proteína 6XHisLmRad9 na forma insolúvel, foram submetidos a

separação por eletroforese em SDS-PAGE. Após corar o gel com *Comassie Brilliant Blue R-250*, a banda de 6XHisLmRad9 foi extraída do gel, macerada com nitrogênio líquido, emulsionada com a *Adjuvant Emulsions* (Sigma) e injetada de forma subcutânea em camundongos.

Para geração de anticorpos anti-LmRad9 em coelho, extratos de bactéria, contendo a proteína 6XHisLmRad9 na forma insolúvel, foram submetidos a separação por eletroforese em SDS-PAGE. Após corar o gel com *Comassie Brilliant Blue R-250*, a banda de 6XHisLmRad9 foi extraída do gel e enviada para a empresa Proteimax (<http://www.proteimaxnet.com.br/>) que se encarregou da produção do soro. O soro foi submetido a purificação por afinidade com a proteína 6XHisLmRad9. Para isto, extratos de bactéria, contendo a proteína 6XHisLmRad9 na forma insolúvel, foram submetidos a separação por eletroforese em SDS-PAGE e transferido para membrana de PFDV. A membrana foi corada com solução de *Ponceau* e a banda correspondente a 6XHisLmRad9 foi recortada. Esta peça de membrana foi incubada com o soro anti-LmRad9 e os anticorpos que se ligaram a ela foram depois eluídos com glicina 3M pH 3,0.

O anticorpo anti-LaRpa1 foi gentilmente cedido pela Dra. Maria Isabel N. Cano (UNESP – Botucatu).

O anticorpo anti-GAPDH foi gentilmente cedido pelo Dr. Paul Michels (*University of Louvain* – Bélgica).

2.8. Preparação de Bactérias Eletrocompetentes e Eletroporação.

Para o preparo de bactérias eletrocompetentes foi utilizado uma colônia de bactéria *E. coli* da linhagem DH10BTM (Invitrogen) ou da linhagem BL21(DE3) (Invitrogen). A primeira foi empregada para transformar produtos de ligação e a segunda em experimentos de expressão heteróloga de proteínas recombinantes. A colônia isolada foi inoculada em 2mL de meio LB líquido (bacto triptona 10g/L; extrato de levedura 5g/L; NaCl 10g/L) e mantida sob agitação constante de 300rpm a 37°C por 16 horas. Este volume foi transferido para 500mL de meio TY (bacto triptona 2%; extrato de levedura 0,5%) e incubado a 37°C, sob agitação constante de 300rpm até que a cultura atingisse OD₆₀₀ ~0,4. As células foram resfriadas em gelo e coletadas por centrifugação (3200g por 5 minutos a 0°C). As células foram lavadas duas vezes em 50mL de água deionizada estéril, resfriada no gelo, nas mesmas condições de centrifugação. Depois, as células foram lavadas duas vezes em 25mL de glicerol 10% (v/v). A massa final de

células foi suspensa em 0,5mL da solução de glicerol 10%, distribuído em alíquotas de 40µL e estocadas a -70°C.

Para a transformação de bactérias através de eletroporação, o DNA foi misturado com uma alíquota de célula eletrocompetentes. O pulso elétrico aplicado 2500V com o aparelho *E. coli Pulser* (BioRad). As células foram recuperadas em 1mL de meio LB líquido por 1 hora a 37°C sob agitação constante de 300rpm. A seleção de transformantes foi feita em placas com meio LB semi-sólido (LB com ágar 1,5% [m/v]) contendo as drogas necessárias. Ampicilina foi utilizada na concentração de 100µg/mL para selecionar construções com os vetores pGEM, pXG1 e pGEX2T. Kanamicina foi utilizada na concentração de 30µg/mL para selecionar construções com o vetor pET28a.

2.9. SDS-PAGE

Todas as análises de SDS-PAGE apresentadas neste trabalho foram conduzidas em gel de poliacrilamida 10%. O tampão de corrida utilizado foi Tris 25mM, glicina 250mM, SDS 0,1% (m/v), pH 8,5. As amostras foram aquecidas a 95°C, em tampão de amostra (Tris 50mM pH6,5; DTT 10mM; azul de bromofenol 0,1% (m/v), glicerol 10% (m/v)), durante 10min antes de serem aplicadas no gel. Todas as corridas de eletroforese foram realizadas em voltagem constante de 50V durante 2-3h. Após o termino da eletroforese, o gel foi corado com *Comassie Brilliant Blue R-250* ou processado para western blotting conforme descrito abaixo.

2.10. Obtenção de Extratos de Proteínas Totais de *L. major*

Para obter os extratos de proteínas totais utilizados para as análises da Figura 17C, Figura 25D, Figura 26C e Figura 31B as células foram recolhidas por centrifugação e lavadas uma vez em PBS 1X. A seguir, as células foram suspendidas vigorosamente em tampão de corrida de amostra de SDS-PAGE, em uma concentração de 5×10^5 células/µL. Esta mistura foi incubada a 95°C, durante 15min. Entre 5-10µL da mistura final foi aplicado para eletroforese.

2.11. Expressão de Proteínas Heteróloga e Obtenção de Extratos de Proteínas de *E. coli*

A indução das proteínas recombinantes GSTLmHus1 e 6XHisLmRad9 apresentadas na Figura 14Ce Figura 25C, foi conduzida com IPTG 0,5mM a 37°C, durante 4h e com agitação de 180rpm.

Após o período de indução, as células foram coletadas por centrifugação e suspendidas em tampão de lise (Tris 50mM pH 7,5; coquetel de inibidores de protease (Roche) 1X). A suspensão foi submetida a pulsos de ultrassom até que nenhum agregado de células fosse visível. O extrato resultante foi submetido a centrifugação a 15,000g, a 4 °C, durante 30min. O sobrenadante final foi considerando a fração contendo proteínas solúveis. O precipitado foi considerado a fração contendo proteínas insolúveis e foi suspenso em tampão de solubilização (Tris 50mM pH 7,5; ureia 8M; coquetel de inibidores de protease (Roche) 1X).

2.12. Obtenção de Sondas para as Análises de *Southern Blotting* e *Northern Blotting*

A sonda de 692pb para o gene codificador de LmHus1 (utilizada nos experimentos da Figura 17B e Apêndice G) foi obtida por digestão do plasmídeo pGEMLmHus1 com a enzima de restrição *EcoRI*. A sonda de 300pb para sequências teloméricas (utilizada nos experimentos da Figura 19A, Figura 19C e Apêndice H) foi obtida por digestão do plasmídeo pTEL (Van der Ploeg, Liu et al. 1984) com enzima de restrição *HindIII*. A sonda de 2500pb para o gene codificador de LmRad9 (utilizada para o experimento do Apêndice O) foi obtida por digestão do plasmídeo pGEMLmRad9 com a enzima de restrição *EcoRI*. A sonda de 100pb para o gene codificador da marca de seleção SAT (utilizada nos experimentos do Apêndice G) foi obtida por reação de PCR com os *primers* SAT-Fw (CGCTCTAGAGGATCCAGGCGTTCGAA) e SAT-Rv (CGCAGATCTA GATCTCCGAGGCCTG). A sonda de 800pb para as sequências repetitivas RIME (utilizada nos experimentos da Figura 19C) foi obtida por digestão do plasmídeo pELHYGH20.8 com a enzima de restrição *SacIII*.

2.13. Eletroforese de DNA em Gel de Agarose

As análises de fragmentos de DNA gerados nas reações com enzimas de restrição ou PCR foram realizadas por eletroforese (90V) durante 1h, em tampão TAE 1X (Tris-Acetato 0,04M; EDTA 0,0001M) e gel de agarose 0,8% (m/v). Para as análises da Figura 17B e Figura 19A a eletroforese (20V) foi conduzida por 20h em agarose 0,6% (m/v). Os géis foram corados com brometo de etídio 0,5mg/L por 20 min e observados em luz ultravioleta.

Para obtenção dos cromossomos utilizados nas análises de PFGE, as células foram coletadas por centrifugação a 1000g por 10 min e transferidas para M199 2X sem soro fetal bovino de modo a formar uma suspensão de $3,0 \times 10^8$ células/mL. A esta suspensão, foi adicionado o mesmo volume de tampão de preparo de cromossomos (NaCl 130mM; Na_2HPO_4 142mM; NaH_2PO_4 8mM; glicose 2%) aquecido com 2% (m/v) de agarose de baixo ponto de fusão. Esta mistura foi distribuída igualmente em alíquotas de 63μL formas acrílicas específicas para esta finalidade até a solidificação da agarose. Os blocos formados foram mantidos por 48h a 42°C em solução de lise (EDTA 0,5M, pH 9; SDS 1%; proteinase-K 0,5mg/mL). Depois foram mantidos por 48h sob agitação gentil em solução de Tris/EDTA (Tris-HCl 200mM; EDTA 100mM), que era renovada a cada 12 h. Os blocos foram estocados nesta solução a 4°C.

Os cromossomos preparados desta forma foram analisados através de PFGE em tampão TBE 0,5X (Tris 0,045M; Ácido Bórico 0,045M; EDTA 0,001M) em gel de agarose 1,0% (m/v). A eletroforese foi conduzida no aparelho *CHEF MAPPER* (BioRad) nas condições especificadas: (i) Análise de cariótipo total (Apêndice H) - pulsos 24min:03seg e 3min:24seg; gradiente 6.0 V/cm; ângulo de 120°; temperatura de 14°C; tempo de corrida de 29 h. (ii) Análise de moléculas extracromossomais (Apêndice G) – pulso constante de 10 seg; gradiente 4,5 V/cm; ângulo de 120°; temperatura de 14°C; tempo de corrida de 18 h.

2.14. Imunoprecipitação

Para os experimentos de imunoprecipitação apresentados na Figura 22 e Figura 29C, $\sim 2 \times 10^9$ células foram lavadas duas vezes com PBS 1X gelado e suspendidas homogeneamente em tampão de lise (20mM Tris, pH 7,5; NaCl 300mM; NP40 0.05% (v/v); glicerol 20% (v/v); DTT 1mM; Na_3VO_4 5mM; coquetel de inibidores de protease (Roche) 1X). A suspensão foi mantida em gelo durante 20min e agitada vigorosamente

durante 30seg a cada 5min. O extrato foi centrifugado a 18,000g e 4°C durante 20min. O sobrenadante foi diluído com tampão de lise para concentração final de 150mM de NaCl. O extrato foi incubado com *beads* de agarose-proteína A (Roche) durante 1h a 4°C, com agitação suave. As *beads* foram removidas e o extrato foi incubado com 50µL de anticorpo anti-LmHus1 produzido em camundongo durante 18h a 4°C, com agitação suave. Em seguida, 200µL *beads* agarose-proteína A (Roche) foram adicionados e a suspensão foi mantida por mais 2h a 4°C, com agitação moderada. As *beads* foram recolhidas por centrifugação a 3,000g durante 1min, a 4°C. Em seguida foram lavadas três vezes com o tampão de lise desprovido de NP40 e contendo NaCl 150mM e coletadas por centrifugação a 3,000g durante 1min, a 4°C. O material restante foi suspenso em 100µL de tampão de amostra de SDS-PAGE.

Para o experimento de imunoprecipitação apresentado na Figura 22, 100µL do anticorpo anti-LmHus1 de camundongo foi covalentemente ligado às *beads* antes de ser incubado com o extrato. Para isso, as *beads* foram incubadas com a solução de anticorpo em PBS 1X, contendo BSA 0,1% (m/v), durante 1h a 4°C. As *beads* foram coletadas e lavadas duas vezes em PBS 1X. A seguir, o complexo *beads*-anticorpo foi incubado com DMP (Sigma) 20mM em HEPES 0,2M pH 8,5 durante 1h em temperatura ambiente, com agitação suave. A seguir, as *beads* foram lavadas três vezes com PBS 1X e depois com o tampão de lise previamente diluído para NaCl 150mM. Os passos seguintes da imunoprecipitação foram idênticos aos descritos acima.

2.15. *ChIP* (Chromatin Immunoprecipitation)

Para os experimentos de imunoprecipitação apresentados na Figura 19C, em uma cultura contendo $\sim 2 \times 10^8$ células foi adicionado formaldeído na concentração final de 1% (v/v). A mistura foi incubada durante 20min em temperatura ambiente, com agitação suave, e ao fim deste período foi adicionado glicina na concentração final de 0,5M. As células foram coletadas por centrifugação e lavadas duas vezes com PBS 1X gelado. A seguir, as células foram suspensas em tampão de lise (HEPES 50mM pH 7,5; MgCl₂ 10mM; KCl 0,2M; EDTA 0,1mM; glicerol 10% (v/v); Triton X-100 1% (v/v); coquetel de inibidores de protease (Roche) 1X) e lisadas com três pulsos de 30seg de ultra som. O extrato contendo a mistura de proteínas ligadas covalentemente ao DNA foi centrifugado a 10,000g, 4°C, durante 20min.

O extrato foi submetido à imunoprecipitação como descrito acima. As beads foram lavadas três vezes no tampão de lise. O material imunoprecipitado foi suspenso em TE e incubado por 3h a 65°C para desfazer as ligações covalentes entre DNA e proteínas. A seguir, o DNA foi extraído com fenol/clorofórmio e processado para Southern blotting como descrito abaixo.

2.16. Obtenção de RNA Total

A extração de amostras de RNA utilizadas nas análises de *northern blotting* do Apêndice H e Apêndice O foi realizada com o reagente TRIzol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As células foram coletadas por centrifugação a 1000g, em temperatura ambiente e imediatamente suspensas com agitação vigorosa em 1mL do reagente. A suspensão foi misturada por agitação vigorosa com 0,2mL de clorofórmio. Esta mistura foi incubada durante 5 minutos em gelo e centrifugada a 12000g, 4°C, durante 15min. A fase aquosa foi cuidadosamente coletada e misturada com isopropanol (50% do volume coletado). A solução foi centrifugada a 12000g, 4°C, durante 15min e o precipitado foi lavado com etanol 80% (v/v). Quando usadas imediatamente após a extração, as amostras de RNA eram suspensas em H₂O tratada com DEPC e quantificadas com base na absorção da luz $\lambda=260/280\text{nm}$. Para uso posterior, as amostras foram suspensas em etanol 75% (v/v) e estocadas a -70°C.

2.17. Northern Blotting

Para análise de *northern blotting*, as amostras de RNA (20–50µg) foram separadas por eletroforese (18V) durante 20h, em gel de agarose contendo formaldeído 1,5% (v/v). Após a separação, o gel foi mantido sob agitação em água tratada com DEPC durante 20min. A seguir, o gel foi mantido, sob agitação, em SSPE 10X (NaCl 0,15M; EDTA 1mM; Fosfato de Sódio 10mM; pH 7.4) durante 20min. As amostras foram transferidas para membrana *Hybond-N+* (Amersham) por capilaridade com solução SSPE 10X, durante 24h. O RNA foi fixado à membrana por exposição à luz ultravioleta durante 1min. A hibridização foi conduzida com os reagentes do sistema *AlkPhos Direct Labeling and Detection System with CDP-Star* (Amersham) seguindo as instruções do fabricante. A temperatura de hibridização empregada foi de 60°C. A detecção do sinal de hibridização foi realizada através da exposição da membrana ao *Hyperfilm ECL* (Amersham). As imagens dos filmes referentes às análises de *northern*

blotting apresentadas neste trabalho foram transformadas em formato digital com *scanner* HP Scanjet G2710.

2.18. Southern Blotting

Para os dados apresentados na Figura 19A e Apêndice G, o gel contendo o DNA foi submergido em solução de HCl 0,25M durante 10 minutos. A seguir, o gel foi incubado durante 15min em solução desnaturante (NaCl 1,5M; NaOH 0,5M) e mais 15min em solução neutralizante (NaCl 1,5M; Tris-HCl 0,5M pH 7,0). O gel foi equilibrado com SSPE 10X durante 20min. O DNA foi transferido para membrana *Hybond-N+* (Amersham) por capilaridade com solução SSPE 10X, durante 24h. O DNA foi fixado à membrana por exposição à luz ultravioleta durante 1min. A hibridização foi conduzida com os reagentes do sistema *AlkPhos Direct Labeling and Detection System with CDP-Star* (Amersham) seguindo as instruções do fabricante. A temperatura de hibridização empregada foi de 60°C. A detecção do sinal de hibridização foi realizada através da exposição da membrana ao *Hyperfilm ECL* (Amersham).

Para o dado apresentado na Figura 19C, os produtos de imunoprecipitação foram incubados com NaOH 0,2M durante 10min em temperatura ambiente. Acetato de Sódio foi acrescentado na mistura para concentração final de 1,5M. A seguir, a mistura foi diluída com SSPE 6X (20 vezes o volume da amostra). As amostras foram transferidas para membrana *Hybond-N+* (Amersham) a vácuo utilizando um aparato apropriado para *slot blot*. Depois da transferência, cada canal contendo o DNA transferido foi lavado duas vezes com SSPE 6X. A seguir, o DNA foi fixado à membrana por exposição à luz ultravioleta durante 1min. A hibridização foi conduzida exatamente como descrita acima. As imagens dos filmes referentes às análises de *Southern blotting* apresentadas neste trabalho foram transformadas em formato digital com *scanner* HP Scanjet G2710.

2.19. Western Blotting

Após a separação por SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (Amersham) com o aparelho TE 70 PWR (Amersham). A transferência foi conduzida em tampão de transferência (Tris 24mM; glicina 192mM; Metanol 20% (V/V)) durante 2,5h, com uma corrente elétrica de 50mA. A membrana foi bloqueada com PBS 1X contendo Tween20 0,1% (v/v) (PBS-T) e leite em pó

desnatado 5% (m/v) durante 16 horas a 4°C. A membrana foi brevemente enxaguada com PBS-T duas vezes e incubada com o anticorpo primário. Esta incubação foi realizada por três horas, em temperatura ambiente, com agitação, em PBS-T contendo leite em pó desnatado 3% (m/v). As diluições dos anticorpos primário foram: anti-LmHus1 de coelho 1:2000; anti-LmRad9 de coelho 1:2000; anti-LaRpa1 de coelho 1:2000; anti-GAPDH de coelho 1:10000; anti-GFP de camundongo (Roche) 1:2000. Após incubação com anticorpo primário, a membrana foi sequencialmente lavada durante 5, 10 e 15 minutos em PBS-T. Em seguida, a membrana foi incubada durante 1h em temperatura ambiente com PBS-T contendo leite em pó desnatado 3% (m/v) e anticorpo secundário anti-*Rabbit* (Amersham), conjugado com peroxidase, na diluição de 1:10000. Após incubação com anticorpo secundário, a membrana foi sequencialmente lavada durante 5, 10 e 15 minutos em PBS-T. A membrana foi processada com *ECL Western Blotting Detection Reagent* (Amersham) e exposta a *Hyperfilm ECL* (Amersham). As imagens dos filmes referentes as análises de *western blotting* apresentadas neste trabalho foram transformadas em formato digital com *scanner* HP Scanjet G2710.

2.20. Imunofluorescência

As células foram coletadas por centrifugação a 1000g, em temperatura ambiente, durante 10min e lavadas uma vez em PBS 1X. A fixação foi conduzida a temperatura ambiente durante 20 min, com Paraformaldeído (*Electron Microscopy Science*) na concentração de 3% (v/v). As células foram coletadas, suspensas em PBS 1X contendo glicina 0,1% (m/v) e aderidas em lamínulas previamente tratadas com Biobond (*Electron Microscopy Science*). O período de adesão foi de 30 min em temperatura ambiente seguido de duas lavagens com PBS 1X. Em seguida, as células foram permeabilizadas com PBS 1X contendo Triton X-100 0,3% (v/v), durante 30 min em temperatura ambiente seguida de 5 lavagens com PBS. As células foram bloqueadas com PBS 1X contendo BSA 2% (m/v) e soro de cabra 5% (v/v) durante 1h em temperatura ambiente. O anticorpo primário, foi diluído em PBS 1X contendo BSA 1% (m/v) e a incubação foi conduzida por 2 h, em temperatura ambiente e seguida de 8 lavagens com PBS 1X. As diluições dos anticorpos primários foram: anti-LmHus1 de camundongo 1:500; anti-LmHus1 de coelho e purificado 1:100; anti-LmRad9 de coelho purificado 1:500; anti-LmRad9 de camundongo 1:500; anti-LaRpa1 de coelho 1:2000. A seguir, as células foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho ou anti-

camundongo, conjugado com Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 594 (Invitrogen), diluído na proporção de 1:400 em PBS 1X. A incubação foi realizada em temperatura ambiente durante 50min. As células foram lavadas 8 vezes com PBS 1X e as lâminulas foram montadas sobre lâminas contendo *ProLong® Gold Antifade Reagent contendo DAPI* (Invitrogen). As imagens da Figura 15 e Apêndice E foram obtidas com microscópio invertido *DMI 4000B (Leica)* acoplado com câmera *DFC340 Fx (Leica)*. Todas as demais imagens foram obtidas em microscópio confocal *TCS SP5 (Leica)*.

2.21. Fracionamento Celular e Isolamento de Proteínas Associadas à Cromatina

Para o fracionamento utilizado na análise de western blotting da Figura 21B, foi empregado o sistema *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Thermo Scientific), seguindo os procedimentos recomendados pelo fabricante.

Para o isolamento da cromatina nos experimentos apresentados na Figura 16C e Figura 31A, utilizamos procedimento descrito anteriormente (Mendez and Stillman 2000). Aproximadamente 10^8 células foram centrifugadas a $1,000g/4^{\circ}C/5min$, lavadas uma vez em PBS 1X gelado e suspensas no Tampão A (HEPES 10mM, pH 7.5; KCl 10mM; $MgCl_2$ 1.5mM; sacarose 0,34M; Glicerol 10% (v/v); DTT 1mM; Na_3VO_4 5mM; coquetel de inibidores de protease (Roche) 1X). Triton X-100 para concentração final de 0,1% (v/v) foi adicionado e as células incubadas em gelo durante 5 minutos. O núcleo foi coletado por centrifugação a $1300g/4^{\circ}C/5min$ e lavado em Tampão A. O material foi suspenso em Tampão B (EDTA 3mM; EGTA 0.2mM; DTT 1mM; Na_3VO_4 5mM; coquetel de inibidores de protease (Roche) 1X) e mantido em gelo durante 30min. A suspensão foi centrifugada a $12,000g/4^{\circ}C/10min$. O sobrenadante (proteínas solúveis do núcleo) foi separado e o precipitado (proteínas insolúveis ligadas à cromatina) foi lavado com Tampão B, suspenso em tampão de amostra de SDS-PAGE e pulsado com ultrassom.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. A ORF LmjF23.0290 Codifica Uma Proteína Possivelmente Homóloga de Hus1

3.1.1. Análise da Estrutura de Lm331

No intuito de identificar possíveis proteínas homólogas de Hus1, nós utilizamos as sequências primárias de aminoácidos das proteínas Hus1 de *Homo sapiens* (HsHus1) e *Schizosaccharomyces pombe* (SpHus1) como isca em buscas no genoma de *L. major* através do programa *BLAST*. Nós encontramos uma proteína hipotética, codificada pela ORF LmjF23.0290, cuja sequência primária predita contém 331 aminoácidos (Lm331) com identidade de 11,7 e 12,7% com as proteínas HsHus1 e SpHus1, respectivamente (Nunes, Damasceno et al. 2011)(veja alinhamento apresentado no Apêndice C). Devido a identidade relativamente baixa entre Lm331 e

Figura 11. LmHus1 (Lm331) Contém Domínio Homólogo a Proteínas da Família Hus1/Mec3. (A) Representação esquemática da estrutura primária de aminoácidos das proteínas Hus1 de *H. sapiens* (HsHus1) e Lm331. Os dígitos à direita e esquerda na porção superior de cada proteína refere-se ao número de aminoácidos. A região de cada proteína que apresenta homologia com a família Hus1/Mec3 - (PF04005 – número de cadastro no banco de dados de famílias de proteínas, Pfam (pfam.sanger.ac.uk/)) de acordo com a identificação realizada no InterPro (www.ebi.ac.uk/interpro/) - está representada como um retângulo rosa. **(B)** Estrutura secundária da proteína Lm331, de acordo com predição realizada por PHYRE 2 (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/). As setas amarelas representam folhas beta. Os retângulos vermelhos representam alfa hélices.

HsHus1 e SpHus1, decidimos examinar se Lm331, ou pelo menos parte de sua sequência, poderia ser considerada homóloga de Hus1. Para isto, submetemos a sua sequência primária à análise e classificação pelo banco de dados InterPro. Como apresentado na Figura 11A, a sequência completa de Lm331 foi identificada como pertencente à família Hus1/Mec3. Para o propósito de comparação, nós também submetemos a sequência primária de HsHus1 para a mesma análise e observamos que, semelhante à Lm331, toda a extensão da proteína foi identificada como pertencente a família Hus1/Mec3. Este dado indica que, apesar da baixa identidade entre sequência primária de Lm331 e de HsHus1 e SpHus1, é possível que sua estrutura secundária ou terciária tenham sido conservadas, o que justificaria a sua classificação na família Hus1/Mec3.

Figura 12. LmHus1 (Lm331) Possui Estrutura Terciária Semelhante a HsHus1. Representação do modelo estrutural de Lm331 (a esquerda) e HsHus1 (a direita). As alfa hélices H1, H2, H3 e H4 estão indicadas. *IDC loop*. As letras *C* e *N* indicam a região onde se encontram a extremidade carboxílica e amina, respectivamente. Estas representações moleculares foram geradas com PyMol (www.pymol.org/). Para o modelo de HsHus1 foi utilizado o arquivo 3ggr do banco de dados de estrutura de proteínas, PDB (www.rcsb.org/pdb/home/home.do).

Para checar esta possibilidade, nós decidimos investigar o grau de conservação da estrutura secundária de Lm331 em relação a outras proteínas Hus1. Então, submetemos sua sequência primária para análises estruturais no servidor PHYRE 2. Na Figura 11B, está apresentado o padrão de estrutura secundária predita gerada nesta análise. É interessante notar que este padrão é muito parecido com a estrutura secundária de HsHus1 (veja estrutura secundária de HsHus1 no Apêndice D), dando suporte à ideia de que a estrutura de Lm331 tenha sido conservada. Nós então

comparamos o modelo tridimensional predito para Lm331 com a estrutura cristalográfica de HsHus1 e, em conformidade com o dado anterior, verificamos uma grande similaridade estrutural entre as duas proteínas. Na Figura 12 é possível identificar no modelo estrutural de Lm331 todos os motivos estruturais presentes em HsHus1. Semelhante à HsHus1, a estrutura terciária predita para Lm331 apresenta dois domínios globulares, contendo cada um deles as extremidades carboxi e amino conectados pelo *IDC loop*. É interessante apontar também o posicionamento das alfa hélices H1, H2, H3 e H4 na região correspondente a face interna do grampo do complexo 9-1-1 (veja estrutura do complexo 9-1-1 na Figura 10).

Nós inferimos que estes dados suportam substancialmente a hipótese de que Lm331 seja uma proteína homóloga de Hus1 em *L. major*. A discrepância entre conservação da estrutura primária e da conservação da estrutura terciária de Lm331 em relação a HsHus1 e SpHus1, sugere a existência de pressão seletiva para manutenção de sua estrutura terciária e, possivelmente, de sua função. Dessa forma, é razoável inferir que apenas aquelas mutações na estrutura primária de Lm331 que permitiram a manutenção da estrutura tridimensional de Hus1 foram selecionadas durante o curso evolutivo do parasita *L. major*.

3.1.2. Análise Filogenética de Lm331

Mesmo que as análises da estrutura de Lm331 possam suportar a hipótese de que esta seja uma proteína homóloga de Hus1, ainda devemos ser cautelosos quanto a esta conclusão. Como exposto na Introdução, o complexo 9-1-1 possui estrutura muito semelhante ao PCNA. As funções de PCNA e do complexo 9-1-1, ainda que distintas, referem-se a aspectos relacionados do metabolismo de DNA e não seria surpreendente que a evolução destes trímeros estivesse interligada. Análise realizada por (Dore, Kilkenny et al. 2009) sugere que apesar dos homotrímeros e heterotrímeros envolvidos no metabolismo de DNA terem evoluído independentemente, eles provavelmente são descendentes de um ancestral comum. Consistente com isto, a análise apresentada na Figura 13 indica que as subunidade do complexo 9-1-1 compartilham um ancestral com as subunidades de PCNA, mas são filogeneticamente mais relacionadas entre si do que com as subunidades de PCNA heterotrimérico ou homotrimérico.

Figura 13. LmHus1 (Lm331) e LmRad9 (Lm718) São Filogeneticamente Relacionadas aos Grampos Heterotriméricos Envolvidos na Detecção de Danos no DNA. Filograma radial gerado a partir de alinhamento das sequências de aminoácidos preditas para subunidades do complexo 9-1-1 de eucariotos e PCNA de eucariotos e *archae*. O alinhamento foi realizado com ClustalW. A ramificação referente ao PCNA está demarcada em cinza. As ramificações referentes às subunidades do complexo 9-1-1 estão demarcadas em verde, amarelo e roxo. As sub-ramificações referentes às subunidades do complexo 9-1-1 e PCNA em *L. major* (**Lm**), *L. braziliensis* (**Lb**) e *L. infantum* (**Li**) estão também destacadas. Lm331 está contida no destaque em roxo e Lm718 no destaque em verde. Este filograma foi gerado no Dendroscope 3 (ab.inf.uni-tuebingen.de/software/dendroscope/). Os números de acesso de cada sequência de aminoácido utilizada nesta análise está apresentado na lista do Apêndice B. Esta análise e figura foram gerados com base em publicação prévia (Dore, Kilkenny et al. 2009).

Sabendo que Hus1 possui estrutura tridimensional muito parecida com as subunidades de PCNA, é possível considerar que a estrutura de Lm331 indique sua relação funcional ou evolutiva com os trímeros envolvidos na replicação e não com aqueles envolvidos na detecção de danos no DNA. Para checar esta possibilidade, nós decidimos examinar a relação filogenética entre Lm331 e as subunidades do complexo 9-1-1 de outros eucariotos e também com as subunidades de PCNA heterotrimérico e

homotrimérico. Como podemos observar no filograma apresentado Figura 13, Lm331, assim como seus ortólogos em *L. infantum* e *L. braziliensis*, está agrupada na ramificação contendo as subunidades Hus1 do complexo 9-1-1 de eucariotos. Com base nesta análise, é possível interpretar que a proteína Hus1 surgiu na linhagem eucariótica em algum momento anterior a divergência dos tripanossamatídeos e que há uma relação filogenética estreita entre Lm331 e a família Hus1/Mec3. Além disso, é possível inferir que é mais provável que Lm331 tenha evoluído a partir do processo de seleção que originou as proteínas Hus1 do que a partir do processo seletivo que moldou os trímeros envolvidos na replicação.

Desta forma, este conjunto de informações nos permite considerar que Lm331 seja homóloga da proteína Hus1 em *L. major*. E por isto a denominamos LmHus1.

3.2. LmHus1 Localiza-se no Núcleo de *L. major*

3.2.1. Expressão Heteróloga de LmHus1 e Produção de Anticorpos Anti-LmHus1

Para a caracterização funcional de LmHus1, nós decidimos gerar uma construção de DNA (pGEXGSTLmHus1), apresentada na Figura 14A, codificadora para a proteína GSTLmHus1 (fusão amino terminal de LmHus1 com GST (Glutathione S-Transferase)). A análise dos produtos de digestão com enzimas de restrição, mostrada na Figura 14B, apresenta o padrão de bandas esperado para esta construção (*Ssp*I: 3776 e 2187 pb. *Pst*I: 4041, 1449, 381 e 42 pb (a última banda não é visível neste gel)). A seguir, bactérias foram transformadas com pGEXGSTLmHus1 para expressão de GSTLmHus1. Na Figura 14C, está representada uma análise de SDS-PAGE onde é possível observar o aparecimento de uma banda com massa molecular esperada (~63 kDa) para GSTLmHus1, na fração insolúvel de extratos de bactérias transformadas com pGEXGSTLmHus1 e induzidas com IPTG. Tendo em vista a possibilidade de empregar GSTLmHus1 em ensaios de *pull down*, para identificação de possíveis proteínas parceiras de LmHus1, nós tentamos obter quantidades suficiente desta proteína em sua forma nativa através de diferentes condições de indução e extração. Nenhuma de nossas tentativas foi bem sucedida e, pelo menos para este propósito, não pudemos utilizar GSTLmHus1.

Figura 14. Expressão Heteróloga de LmHus1 e Teste de Anticorpo anti-LmHus1.

(A) Representação da construção pGEXGSTLmHus1: ORF LmjF23.0290 (LmHus1) clonada no vetor pGEX-2T. **ATG**: região codificadora do códon de iniciação de tradução de **GST** (glutathione S-transferase). **SCM**: sítio de clonagem múltiplo. **AMP**: região contendo o gene codificador da proteína que confere resistência a ampicilina em *E. coli*. **Ori**: Origem de Replicação. **lac**: promotor de expressão de genes envolvidos no metabolismo de lactose em bactéria. As linhas tracejadas indicam a posição aproximada dos sítios de restrição. Estas enzimas foram empregadas para análise apresentada em (B). **pb**: pares de bases. (B) Eletroforese de produtos de digestão da construção apresentada em (A). As enzimas utilizadas estão indicadas em cada canaleta. **M**: marcador de tamanho de DNA. Os números à esquerda indicam o tamanho dos fragmentos de DNA de M em Kb. (C) Análise de SDS-PAGE em gel 12% de amostras de proteína provenientes de bactéria *E. coli* da linhagem BL21(DE3) transformada com a construção apresentada em (A). **M**: marcador de massa molecular de proteínas. Os números à esquerda indicam as massas molares das proteínas de M em kDa. **NI**: não induzido. **IN**: induzido com 0.5 mM IPTG. **P**: precipitado – fração insolúvel do extrato proteico. **S**: solúvel – fração solúvel do extrato proteico. A seta a direita indica a banda correspondente ao tamanho molecular esperado para a proteína GSTLmHus1 encontrada na fração insolúvel do extrato de proteínas de células induzidas. O gel foi corado com *comassie-blue*. (D) Análise de *western blotting* (com soro anti-LmHus1 produzido em coelho) de produtos de imunoprecipitação (**IP**) (conduzida com soro anti-LmHus1 produzido em camundongo). IP foi realizada com extratos de proteínas totais de linhagem selvagem (**WT**) e linhagem superexpressora de LmHus1 (**pXGHus1**). Esta imagem é representativa de pelo menos três experimentos independentes. A mesma membrana também foi sondada com anticorpo anti-GAPDH para controle da quantidade de proteína contida em cada amostra analisada. Os números à esquerda indicam a massa molecular do padrão de massa molecular em kDa.

Então, nós empregamos a proteína GSTLmHus1 na forma insolúvel para produção de anticorpo anti-LmHus1 em camundongos. Para verificar a especificidade deste anticorpo, nós o utilizamos para imunoprecipitar a proteína LmHus1 de extratos proteicos de *L. major* de linhagem selvagem e de linhagem superexpressora de LmHus1 (Nunes, Damasceno et al. 2011). Os produtos de imunoprecipitação foram analisados por *western blotting* utilizando anticorpo anti-LmHus1 produzido em coelho (ver detalhes em materiais e métodos). Nossa análise demonstrou que tanto o anticorpo anti-LmHus1 produzido em camundongo quanto aquele produzido em coelho reconheceram de forma específica uma proteína com massa molecular (~43 kDa) condizente com aquela predita para LmHus1, conforme apresentado na Figura 14D. Além disso, anti-LmHus1 de camundongo, mostrou-se uma ferramenta eficiente para imunoprecipitação e, dessa forma, geramos uma ferramenta para detecção e análise de LmHus1.

3.2.2. Análise da Localização Subcelular de LmHus1

Nós decidimos investigar a localização subcelular de LmHus1. Para isto, nós utilizamos anticorpos anti-LmHus1 produzidos em camundongo e também produzidos em coelho em experimentos de imunofluorescência em células de *L. major* do tipo selvagem. Como discutido no Apêndice E, o resultado desta abordagem sugere que LmHus1 seja uma proteína nuclear neste parasita.

Para obter uma informação mais esclarecedora, nós realizamos experimento semelhante, utilizando linhagem de *L. major* superexpressora de LmHus1. Desta forma, nós pudemos estabelecer parâmetros mais restritivos na calibração do microscópio e reduzir a detecção de fluorescência proveniente de interações inespecíficas do anticorpo sem, no entanto, eliminar o sinal emitido pela detecção específica de LmHus1. O resultado desta abordagem nos permitiu examinar a localização de LmHus1 de forma mais confiável e, como apresentado na Figura 15, podemos inferir esta proteína localiza-se majoritariamente no núcleo da linhagem superexpressora.

Este dado é condizente com a localização subcelular de proteínas homólogas de Hus1 de outros organismos, tais como *H. sapiens* e *S. pombe* (Caspari, Dahlen et al. 2000, Wu, Shell et al. 2005). A localização de Hus1 no compartimento nuclear destes organismos é compatível com a sua função como sensora de danos no DNA (Caspari, Dahlen et al. 2000). Sendo assim, este dado também indica que LmHus1

é uma proteína homóloga de Hus1 de outros eucariotos e sugere sua participação em eventos relacionados ao metabolismo de DNA.

Figura 15. LmHus1 Localiza-se no Núcleo de *L. major*. Análise de imunofluorescência em linhagem superexpressora de LmHus1. Para detecção de LmHus1 (em vermelho) foi utilizado anticorpos anti-LmHus1 produzido em camundongo. O DNA nuclear (*n*) e do cinetoplasto (*k*) foi visualizado utilizando DAPI (em azul). Na coluna nomeada como ‘sobreposição’ está apresentada o resultado da sobreposição digital das imagens referentes à LmHus1 e ao DNA. A barra branca mostrada na primeira imagem corresponde a 5 μ m.

3.3. LmHus1 Reloca-se e Associa-se à Cromatina em Resposta ao Estresse Genotóxico

3.3.1. Análise da Distribuição Nuclear de LmHus1 em Reposta ao Estresse Genotóxico

Proteínas podem se distribuir na célula de modo dependente de sua função e gerar padrões específicos de localização resultante de sua concentração em subcompartimentos celulares. Condizente com esta ideia, muitas proteínas envolvidas na resposta a danos no DNA em eucariotos superiores, incluindo o complexo 9-1-1, formam focos nucleares devido ao seu recrutamento para regiões contendo DNA danificado (Wu, Shell et al. 2005).

Nós decidimos analisar se a localização nuclear de LmHus1 seria alterada, como no exemplo da formação de focos, em resposta ao estresse genotóxico. Para isto,

nós conduzimos análises de imunofluorescência em microscópio confocal em linhagem superexpressora de LmHus1 submetida ao estresse genotóxico. Como apresentado na Figura 16A e Apêndice F, células não tratadas apresentam LmHus1 uniformemente distribuída pelo núcleo. Em contraste, o tratamento com HU ou CPT resultou em um padrão de focos de LmHus1 majoritariamente localizados nas bordas da marcação de DAPI em ~65% e ~95% das células tratadas com CPT e HU, respectivamente. Conforme apresentado na Figura 16B, apenas ~5% das células não tratadas apresentaram o mesmo padrão demonstrando uma diferença significativa em relação à condição de estresse genotóxico. Este dado e a análise apresentada no Apêndice F indicam que o estresse genotóxico resultou na relocação de LmHus1 para regiões periféricas do núcleo e sugere seu recrutamento para as sítios de DNA danificado

É importante considerar aqui as evidências de que eventos relacionados os reparo e replicação do DNA ocorrem majoritariamente na periferia nuclear de alguns tripanossomatídeos (Calderano, de Melo Godoy et al. 2011). Com base nisto, a relocação de LmHus1 sugere não apenas seu recrutamento para as regiões de DNA danificado, mas também serve como uma evidência de que os eventos relacionados à reposta ao dano no DNA ocorram preferencialmente na periferia nuclear em *L. major*.

3.3.2. Análise da Associação de LmHus1 com a Cromatina

Evidências experimentais obtidas de análises bioquímicas *in vitro* e análises *in vivo* indicam que o complexo 9-1-1 associa-se à cromatina em resposta ao estresse genotóxico (Wu, Shell et al. 2005). De modo geral, a formação de focos de proteínas envolvidas na resposta ao dano no DNA correlaciona-se com a associação à cromatina, se não de forma constitutiva, pelo menos em resposta a situações de estresse genotóxico. A observação de que LmHus1 reloca-se no núcleo em resposta ao estresse genotóxico nos instigou a investigar se LmHus1 associa-se com a cromatina.

Para isto, isolamos fração celular, enriquecida em cromatina, de células tratadas com HU por diferentes períodos de tempo. Como apresentado na Figura 16C, análise de *western blotting* detectou LmHus1 nas frações ricas em cromatina em quantidade proporcional ao tempo de tratamento com HU. Como controle de que as frações analisadas continham DNA danificado resultante do estresse replicativo gerado pelo tratamento com HU, nós sondamos a proteína LmRpa1 (proteína que se liga a fita simples de DNA, apresentada na Figura 21). Com esta análise nós observamos que a

Figura 16. LmHus1 Reloca e Associa-se a Cromatina em Resposta ao Estresse Genotóxico. (A) Análise de imunofluorescência em linhagem superexpressora de LmHus1 tratada com as doses indicadas de HU ou CPT ou não tratada (NT). Para detecção de LmHus1 (em vermelho) foi utilizado anticorpos anti-LmHus1 produzido em coelho e purificado por afinidade. O DNA nuclear (n) e do cinetoplasto (k) foram visualizados utilizando DAPI (em azul). Na coluna nomeada como ‘sobreposição’ está apresentada a imagem resultante da sobreposição digital das imagens referentes a LmHus1 e ao DNA. Na coluna nomeada como ‘aumento’ está apresentado o resultado de zoom digital da imagem apresentada na coluna nomeada como sobreposição. A barra branca mostrada na primeira imagem corresponde a 5 μm. (B) Representação gráfica da porcentagem de células do experimento apresentado em (A) que apresentaram LmHus1 reposicionada na periferia nuclear. Imagens de dois experimentos independentes foram analisadas por dois indivíduos. As linhas no topo das barras pretas representam o desvio padrão. (n) indica o número de núcleos analisados em cada condição. (C) Análise de *western blotting* de frações celular rica em cromatina preparadas a partir de linhagem superexpressora de LmHus1 (ver detalhes em Material e Métodos). As células foram expostas a dose indicada de HU pelos tempos indicados antes de serem submetidas ao fracionamento. A detecção de LmHus1 foi conduzida com anticorpo anti-LmHus1

associação de LmRpa1 às frações analisadas também era proporcional ao tempo de tratamento com HU. Além disso, o tratamento com nuclease micrococcal reduziu significativamente o sinal de LmHus1 e LmRpa1 nestas frações, indicando que sua localização ali era dependente de ácidos nucleicos. Este dado suporta a ideia de que a metodologia empregada nos permite monitorar tanto o aparecimento de lesões de DNA como também a associação de proteínas com a cromatina devido ao tratamento com HU.

Este dado, em adição a relocação de LmHus1, é condizente com observações da associação de proteínas de resposta ao dano, incluindo o complexo 9-1-1, com a cromatina. Estes resultados sugerem que esta proteína é recrutada para as regiões de cromatina lesionada pelo tratamento com a HU e suporta a ideia de seu envolvimento em eventos de resposta a danos na estrutura do DNA.

continuação. Figura 16. LmHus1 Reloca e Associa-se a Cromatina em Resposta ao Estresse Genotóxico. produzido em coelho. A mesma membrana foi sondada com anticorpo anti-LaRpa1 produzido em coelho (apresentado na Figura 21). Uma banda inespecífica reconhecida pelo anticorpo anti-LmHus1 está indicada como ‘controle’ e serve como demonstração de quantidade de proteína de cada amostra analisada. *MNase* indica que as células foram tratadas (+) ou não (-) com nuclease micrococcal antes do fracionamento. Os números à esquerda indicam a massa molecular em kDa do padrão de massa molecular. Esta imagem é representativa de pelo menos dois experimentos independentes.

3.4. Geração de Linhagem Expressando Níveis Reduzidos de LmHus1

Para melhor investigar a função de LmHus1, nós decidimos gerar uma linhagem com níveis reduzidos de LmHus1. Um trabalho anteriormente desenvolvido em nosso laboratório (Projeto FAPESP 07/55728-8) conduziu a geração e caracterização inicial desta linhagem. Para este propósito, foi utilizada a estratégia de ruptura gênica pela inserção do transposon Neo*ELSAT na região 5' da ORF codificadora de LmHus1, conforme representação mostrada na Figura 17A. Células do parasita *L. major* de linhagem selvagem foram transfectadas com esta construção e os clones foram selecionados na presença de nourseotricina. Para checar se houve substituição de um dos alelos de LmHus1 pelo cassete LmHus1::Neo*ELSAT, nós conduzimos análise de *Southern blotting* de DNA genômico, digerido com enzima de restrição, proveniente de linhagem selvagem e de um clone selecionado da transfecção mencionada. O resultado da análise, mostrada na Figura 17B, indicou que, naquele clone analisado, uma das cópias de LmHus1 havia sido substituída pelo cassete LmHus1::Neo*ELSAT. Análises de PCR e de PFGE, apresentadas no Apêndice G, corroboram a conclusão de que esta linhagem seja heterozigota para o gene codificador de LmHus1 pois carrega uma das cópias deste gene interrompida.

É esperado que a inserção do transposon cause a interrupção da fase de leitura, resultando em terminação prematura da tradução e redução dos níveis de LmHus1. Para verificar esta predição, realizamos análises de *western blotting* de extratos de proteínas totais de *L. major* de linhagem selvagem e de linhagem heterozigota para LmHus1. Como apresentado na Figura 17C, observamos que os níveis de LmHus1 na linhagem proveniente da transfecção com LmHus1::Neo*ELSAT correspondiam a ~50% dos níveis de LmHus1 na linhagem selvagem. Os dados provenientes da caracterização desta linhagem nos permite concluir não apenas que seja uma linhagem heterozigota, mas que também expressa níveis reduzidos de LmHus1. Assim, esta linhagem foi denominada de LmHus1+/-.

Vale salientar que vários clones foram obtidos nesta transfecção e nas análises de *Southern blotting* e PCR nenhum deles apresentou padrão corresponde a homozigose para LmHus1::Neo*ELSAT. Esta observação pode ser uma indicação de que a proteína LmHus1 seja essencial para este parasita. Para melhor esclarecer isto, outra abordagem como a substituição da segunda cópia do gene por um cassete com marca de seleção diferente de SAT, deve se empregada. Durante a caracterização e

Figura 17. Caracterização de Linhagem Deficiente para *LmHus1*. (A) Representação esquemática do alelo *LmHus1* selvagem está mostrada na porção superior da figura. Na porção inferior, está representada a construção resultante (*LmHus1::Neo*ELSAT*) da reação de transposição *in vitro* utilizando o locus codificador de *LmHus1* e o transposon Neo*ELSAT como substratos da transposase *Mos1* (Augusto, Squina et al. 2004, Damasceno, Beverley et al. 2010). As cabeças de seta na cor vermelha indicam sequências repetitivas de DNA reconhecidas por *Mos1* recombinante durante reação de transposição *in vitro*. A seta cinza indica sequência codificadora para *Neo* (Neomicina Fosfotransferase), que confere resistência ao antibiótico G418 (geneticina). A seta branca indica sequência codificadora para *SAT* (Estreptomicina Acetil Transferase), que confere resistência a Nourseotricina. A bandeira verde indica promotor de transcrição em *E. coli*. *H* indica sítios de restrição para enzima *Hind III* utilizada para análise apresentada em (B). As linhas tracejadas indicam possíveis eventos de recombinação homóloga *in vivo* entre *LmHus1::Neo*ELSAT* e o locus selvagem endógeno de *LmHus1*. (B) Análise de *Southern blotting* de DNA genômico digerido com *Hind III*. O DNA é proveniente de linhagem selvagem (WT) e de um clone (*LmHus1* ^{+/-}) selecionado da transfecção com o fragmento *LmHus1::Neo*ELSAT* apresentada em (A). O painel a esquerda representa os produtos de digestão do DNA com *Hind III* corados com Brometo de Etídio (*EtBR*) após eletroforese em gel de agarose. *M* indica marcador de tamanho de DNA. Os números à esquerda indicam o tamanho dos fragmentos de DNA de *M* em Kb. O painel a direita representa visualização em filme da sondagem dos produtos de digestão com sonda contendo a ORF codificadora de *LmHus1*. As bandas correspondentes ao alelo selvagem e interrompido estão indicadas por setas a direita do painel, e denominadas *LmHus1* e *LmHus1::Neo*SAT*, respectivamente. Os asteriscos indicam bandas resultantes de hibridação inespecífica ou produtos de digestão parcial do DNA. A linha tracejada indica que canaletas foram digitalmente eliminadas das imagens. (C) Análise de *western blotting* de extrato de proteínas totais provenientes de linhagem superexpressora de *LmHus1* (*pXGHus1*), linhagem selvagem (WT) e linhagem heterozigota para *LmHus1* (*LmHus1*^{+/-}). A detecção de *LmHus1* foi conduzida com anticorpo anti-*LmHus1* produzido em coelho e purificado por afinidade. A mesma membrana foi sondada com anticorpo anti-GAPDH para controle das quantidades de

execução dos experimentos envolvendo a linhagem LmHus1+/-, nós tentamos realizar a transfecção de construção pXG1LmHus1 (ORF LmjF23.0290 clonada no vetor pXG1) nesta linhagem. Nosso intuito era gerar uma linhagem LmHus1+/- que expresse LmHus1 a partir de cópia extracromossomal do gene. Desta forma esperaríamos restaurar os níveis de LmHus1 e utilizar a linhagem para examinar a reversão dos fenótipos associados a deficiência de LmHus1. Apesar de muitas tentativas, nós não obtivemos sucesso, pois não conseguimos selecionar nenhum clone sobrevivente das transfecções. Esta observação pode ser consequência das mudanças estruturais na superfície celular (Apêndice T) e também sugere que as células LmHus1+/- podem não suportar a manutenção de cópias de DNA extracromossomais.

3.5. A Linhagem LmHus1+/- Apresenta Defeito de Crescimento

Decidimos investigar o efeito da diminuição dos níveis de LmHus1 na viabilidade do parasita *L. major*. Para isto, comparamos os perfis de proliferação de linhagem selvagem e LmHus1+/- . O gráfico apresentado na Figura 18 demonstra que culturas da linhagem LmHus1+/- apresentou densidade de células significativamente menor em comparação com a linhagem selvagem, a partir do terceiro dia de cultivo. Essa menor densidade em culturas de LmHus1+/- não parece ser consequência de atraso no processo de divisão celular. Se assim fosse, esperaríamos que as células continuassem se dividindo até que atingissem concentrações comparáveis àquelas da linhagem selvagem (veja como exemplo o dado apresentado na Figura 27). Ao contrário disso, nós observamos que a densidade da cultura de LmHus1+/-, e também da linhagem selvagem, não apresentou variação significativa a partir do quarto dia de cultivo, indicando que a partir deste dia estas culturas atingiram a fase estacionária de crescimento.

continuação. Figura 17. Caracterização de Linhagem Deficiente para LmHus1. proteína de cada amostra analisada. Os números à esquerda indicam a massa molecular do padrão de massa molecular em kDa. Os números na porção inferior da imagem representam a densitometria da banda correspondente a LmHus1, conforme análise conduzida com ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij/). Esta imagem é representativa de pelo menos dois experimentos independentes com dois clones distintos.

Este dado é uma indicação de que LmHus1 seja requerida para mecanismos relacionados a proliferação e a sobrevivência deste parasita. Este efeito é condizente com defeitos de crescimento devido à redução da expressão de Hus1 ou da desestabilização do complexo 9-1-1 em outros eucariotos (Bao, Lu et al. 2004). Considerando o possível envolvimento de LmHus1 na resposta ao estresse genotóxico, é provável que o defeito de proliferação da linhagem LmHus1^{+/-} seja consequência do acúmulo de danos no DNA decorrentes do decréscimo dos níveis de LmHus1.

Figura 18. Linhagem de Células com Níveis Reduzidos de LmHus1 Apresenta Defeito de Crescimento. Comparação do perfil de proliferação entre linhagem selvagem (círculos brancos) e linhagem LmHus1^{+/-} (círculos pretos). As células foram inoculadas na mesma densidade (1×10^5 células/ml) e mantidas nas mesmas condições de cultivo. A densidade de células foi examinada a cada 24 horas. As barras representam o desvio padrão. Este gráfico é representativo de pelo menos quatro experimentos independentes com dois clones distintos (veja também o dado representado no Apêndice G).

3.6.LmHus1 Associa-se com Sequências Teloméricas e a Redução dos Seus Níveis Causa Encurtamento de Telômeros

3.6.1. Análise de Fragmentos de DNA Contendo Repetições Teloméricas

Nas células eucarióticas, as extremidades de DNA são naturalmente reconhecidas como estruturas de DNA danificado e prontamente reparadas, como discutimos na Introdução (exemplificado na Figura 6 e Figura 8). Os cromossomos das células eucarióticas são lineares e por isto poderiam representar um paradoxo, uma vez que o reconhecimento das suas extremidades como DNA danificado desencadearia a parada do ciclo celular e inviabilizaria a replicação e perpetuação da vida. Entretanto,

Figura 19. LmHus1 Associa-se com Sequências Teloméricas e a Redução dos Seus Níveis Causa Encurtamento de Telômeros. (A) Análise de *Southern blotting* de TRF (*Terminal Restriction Fragment* – Fragmentos de Extremidade gerados por enzimas de Restrição) de DNA genômico de linhagem selvagem (WT) e de linhagem deficiente em LmHus1 (*LmHus1*^{+/-}). Os números 30 e 60 sob a indicação LmHus1^{+/-} referem-se a geração da qual o DNA genômico foi extraído desta linhagem. As enzimas de restrição utilizadas para a digestão do DNA genômico foram: *Cvi*QI, *Hpa*II, *Alu*I e *Hha*I. O painel a direita representa os produtos de digestão corados com Brometo de Etídio (*EtBR*) após eletroforese em gel de agarose. *M* indica marcador de tamanho de DNA. O painel a esquerda representa visualização em filme da sondagem dos produtos de digestão com sonda contendo repetição telomérica (TTAGGG)_{~50} (Van der Ploeg, Liu et al. 1984). As amostras de DNA de cada linhagem foram analisadas em duplicata. Os números à esquerda indicam o tamanho dos fragmentos de DNA de M em Kb. Esta imagem é representativa de dois experimentos. (B) Representação gráfica da densitometria do sinal correspondente aos fragmentos contendo repetições teloméricas, a partir da imagem apresentada no painel à esquerda no item (A). A densitometria foi conduzida com ImageJ. A intensidade dos sinais foi determinada a partir de uma canaleta de cada par de amostras e está representada em função do tamanho dos fragmentos de DNA (números na porção inferior do gráfico). (a) e (b) indicam regiões contendo diferenças detectáveis quanto à população de fragmentos teloméricos das linhagens analisadas e servem para referências no texto principal. (C) Análise de *ChIP* (*Chromatin Immunoprecipitation* – Imunoprecipitação de Cromatina) de extratos de Proteína-DNA (ver detalhes em Material e Métodos) provenientes de células de linhagem selvagem. O extrato foi imunoprecipitado tanto com o soro pré-imune (PI) ou com anticorpo anti-LmHus1 produzido em camundongo (*LmHus1*). DNA (50%) indica que quantidade equivalente a 50% do extrato utilizado para imunoprecipitação foi

as células eucarióticas evoluíram uma estratégia elegante que consiste no reconhecimento da sequência repetitiva de DNA das extremidades cromossômicas por um conjunto específico de proteínas especializadas nesta função (TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1 e Rap1), conjuntamente chamadas de complexo *shelterin*. A associação entre estas sequências de DNA e o complexo *shelterin* formam estruturas denominadas telômeros cuja função é ocultar as extremidades cromossômicas e impedir, competitivamente, o seu reconhecimento pela maquinaria de detecção e reparo de DNA (Sfeir and de Lange 2012).

Então parece óbvio que proteínas de reparo e sensoras de dano no DNA devessem ser excluídas dos telômeros. Ao contrário disso, existem evidências de que estas proteínas se associam e são necessárias para o funcionamento normal dos telômeros. Depleção da proteína 53BP1 em camundongo, envolvida em reparo de quebra de dupla fita por junção de extremidades não homólogas, resulta em disfunções teloméricas (Martinez, Flores et al. 2012). Outras proteínas como BRCA2, Rad51 e Ku80, envolvidas no reparo por recombinação homóloga, são requeridas para o correto capeamento e replicação das extremidades cromossômicas e também para inibir a ativação de resposta ao dano de DNA nestas extremidades (Badie, Escandell et al. 2010, Didier, Hourde et al. 2012). As proteínas do complexo 9-1-1 também atuam no funcionamento dos telômeros, pois observou-se que o *knock down* de qualquer de suas subunidades causa redução da atividade de telomerase, enzima especializada em replicar as repetições teloméricas (Francia, Weiss et al. 2006).

continuação. Figura 19. LmHus1 Associa-se com Sequências Teloméricas e a Redução dos Seus Níveis Causa Encurtamento de Telômeros. incluído para análise como controle. A membrana contendo os fragmentos de DNA co- imunoprecipitados pelo anticorpo anti-LmHus1 foi sondada com sonda contendo repetição telomérica (TTAGGG)_{~50}. A mesma membrana foi sondada com sequência repetitiva do genoma de *L. major* (RIME) (Dias, Ruiz et al. 2007) para controle de especificidade de co- imunoprecipitação entre LmHus1 e sequências teloméricas. Esta imagem é representativa de dois experimentos independentes. **(D)** Representação gráfica da densitometria das sequências teloméricas co-precipitadas com LmHus1. As linhas verticais, no topos das barras prestas indicam o desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa entre a intensidade do sinal entre precipitação com soro pré-imune e anticorpo anti-LmHus1. O nível de significância foi determinado através de *teste-t* não pareado com valor de *p* correspondente 0.027.

Com base nisso, decidimos avaliar se a diminuição dos níveis de LmHus1 afeta a manutenção dos telômeros em *L. major*. Para isto, realizamos análise de TRF (*Telomeric Restriction Fragment*) de DNA genômico de linhagem selvagem e da linhagem LmHus1+/- . A análise do resultado, apresentada na Figura 19A, aponta uma diferença entre o perfil de fragmentos teloméricos da linhagem selvagem e linhagem LmHus1+/- . A quantificação densitométrica do sinal correspondente a estes fragmentos está apresentada na Figura 19B e indica uma redução significativa do sinal proveniente dos fragmentos na faixa de tamanho entre 6,5 e ~23 kb (designada como ‘a’) na linhagem LmHus1+/- cultivada por 30 gerações. Em adição, nós observamos que nesta linhagem também houve um sensível aumento de intensidade de sinal correspondente aos fragmentos menores que 0,5 kb (designada como ‘b’). Este dado é uma indicação de que a diminuição dos níveis LmHus1 provocou encurtamento dos telômeros e sugere que esta proteína seja necessária para a manutenção dos telômeros neste parasita.

Em oposição ao esperado para o comprometimento da manutenção de telômeros (Basenko, Topcu et al. 2011, Zhao, Abreu et al. 2011), nós não observamos redução significativa do tamanho dos telômeros da linhagem LmHus1 +/-, mesmo após cultivo contínuo até a geração 160 (Figura 19A e Figura 19B), nós não observamos um decréscimo contínuo do tamanho dos telômeros. Este dado sugere que, se LmHus1 está envolvida na manutenção de telômeros, os níveis remanescentes desta proteína na linhagem LmHus1+/- foram suficiente para preservar os telômeros no tamanho observado através das gerações analisadas. Outra explicação possível é que apenas aqueles telômeros de tamanho igual ou superior ao observado permitiram a sobrevivência das células. Esta hipótese é compatível com a observação de que células eucarióticas parecem suportar um limite mínimo de tamanho de telômeros e aqueles telômeros com tamanho abaixo deste limiar geram aberrações cromossômicas ou morte celular devido à perda de proteção e ativação de resposta ao dano de DNA. É válido mencionar também que a redução dos níveis de LmHus1 não causou nenhuma aberração cromossômica detectável resultante, por exemplo, de fusão de cromossomos por perda de telômeros, de acordo com análise de cariótipo apresentada no Apêndice H. Esta observação sugere que um tamanho mínimo de telômero seja necessário para sobrevivência do parasita *L. major*.

3.6.2. Análise da Associação de LmHus1 com Sequências Teloméricas em *L. major*

No intuito de entender o mecanismo pelo qual LmHus1 atua na manutenção de telômeros em *L. major*, nós decidimos testar se esta proteína se associa com sequências teloméricas. Para este propósito, nós realizamos experimentos de imunoprecipitação de cromatina (*ChIP*), com anticorpo anti-LmHus1, a partir de extratos contendo DNA ligado covalentemente a proteínas. O resultado da análise de *Southern blotting* dos fragmentos de DNA coprecipitados com LmHus1 está apresentado na Figura 19C e Figura 19D. O dado obtido indica que sequências teloméricas são coprecipitadas com LmHus1 em quantidade significativamente maior em comparação com o experimento controle, conduzido com soro pré-imune.

Baseando-se neste dado é possível considerar que o efeito de LmHus1 na manutenção de telômero em *L. major* requeira sua associação com as extremidades cromossômicas deste parasita. Não é possível saber, com base apenas nesta análise, se esta associação envolve contato físico com as sequências repetitivas do DNA telomérico ou se é um contato indireto, mediado por outras proteínas. A associação entre o complexo 9-1-1 e telômeros, em mamíferos, garante a estimulação positiva da atividade da enzima telomerase. A atividade desta enzima é detectável em tripanossomatídeos (Cano, Dungan et al. 1999) e, assim como em mamíferos, parece ser requerida para a manutenção das sequências teloméricas (Glover, Alsford et al. 2007). Pensando nisso e considerando a conservação estrutural de LmHus1, sua associação e efeito nos telômeros de *L. major*, especulamos que seja possível que sua função possa envolver a modulação da atividade telomerase neste parasita.

Em suporte a esta hipótese, resultados preliminares da análise da expressão de TERRA (*TElomeric Repeat-Containing RNA*) indicam uma alteração substancial dos seus níveis na linhagem LmHus1+/- . TERRA são RNAs transcritos a partir das extremidades dos cromossomos que, além de regulador da montagem da cromatina telomérica (Deng, Norseen et al. 2009), comportam-se como moduladores negativos da atividade da telomerase *in vitro* (Redon, Reichenbach et al. 2010). O resultado da análise de *northern blotting* de RNA proveniente de linhagem selvagem e da linhagem LmHus1+/-, utilizando sonda contendo sequências teloméricas, está apresentada no Apêndice H. Com base neste resultado, observamos que houve aumento significativo dos níveis de TERRA na linhagem LmHus1+/-, em comparação com a linhagem

selvagem. Este dado indica que a redução dos níveis de LmHus1 acarreta no aumento da atividade transicional das extremidades cromossômicas de *L. major*. Sendo assim, nosso conjunto de dados sugerem que LmHus1 se associa com sequências teloméricas e garante a manutenção das mesmas porque possivelmente inibe a expressão de TERRA (Apêndice H).

3.7. A Redução nos Níveis de LmHus1 Compromete a Resposta Celular ao Estresse Genotóxico

Nós havíamos publicado dados referentes à avaliação do envolvimento de LmHus1 na resposta ao estresse genotóxico em *L. major*. Aqueles dados sugerem que LmHus1 participa na manutenção da estabilidade genômica, uma vez que sua superexpressão resulta em maior resistência a agentes genotóxicos (Nunes, Damasceno et al. 2011). Para entender melhor o mecanismo funcional pelo qual LmHus1 atua na estabilidade genômica, nós decidimos avaliar o efeito da redução de seus níveis na resposta ao dano no DNA. Nossa primeira abordagem consistiu em comparar a proliferação de células da linhagem selvagem e da linhagem LmHus1+/- na presença de drogas genotóxicas. Baseado no resultado desta análise, que está apresentado no Apêndice I, nós não detectamos nenhuma diferença significativa de proliferação entre estas duas linhagens nas condições empregadas, apesar de que um discreto aumento da taxa de proliferação relativa da linhagem LmHus1+/- foi notado. Esta observação pode indicar que os níveis remanescentes de LmHus1 na linhagem LmHus1+/- é suficiente para sustentar a resposta ao estresse genotóxico dependente desta proteína. Ou ainda, se LmHus1 é requerida para manutenção da estabilidade genômica, em condições de contínua exposição aos agentes genotóxicos, vias de resposta ao dano no DNA, independente de LmHus1 podem ser ativada como resultado de uma possível redundância funcional entre as vias sinalizadas por ATM e ATR (Cuadrado, Martinez-Pastor et al. 2006). E não menos considerável, é também a hipótese de que LmHus1 pode não ser diretamente requerida para a sinalização e resposta de danos no DNA causados pelas drogas testadas e os efeitos decorrentes de sua superexpressão poderiam ser efeitos indiretos.

Figura 20. A Redução nos Níveis de LmHus1 Compromete a Resposta Celular ao Estresse Genotóxico. Comparação do perfil de proliferação entre células previamente expostas a 10 μ M CPT (circulo preto), 10mM HU (quadrado preto) ou 0.005% MMS (triângulo preto). Células não tratadas (circulo branco) também foram incluídas como controle. No gráfico a esquerda está representado o perfil de proliferação da linhagem selvagem (*WT*) nas condições mencionadas. No gráfico da direita está representado o perfil de proliferação de linhagem deficiente em LmHus1 (*LmHus1^{+/-}*), também submetido as diferentes condições mencionadas acima. As células foram incubadas por 15 horas com as drogas mencionadas. Após este período as células foram lavadas e inoculadas na mesma densidade (1×10^5 células/ml) e mantidas nas mesmas condições de cultivo. A densidade de células foi monitorada a cada 24 horas. As barras representam o desvio padrão. Estes gráficos são representativos de pelo menos dois experimentos independentes.

Desta forma, decidimos empregar outra abordagem que considerasse o mecanismo geral de resposta ao dano no DNA das células eucarióticas (veja Figura 8). Esse mecanismo consiste na interrupção do ciclo celular em resposta ao DNA danificado até que o mesmo seja reparado. Com base nas evidências experimentais, que indicam a existências de mecanismos de controle semelhantes a este em tripanossomatídeos (Gassen, Brechtefeld et al. 2012), nós decidimos examinar a resposta de células de linhagem selvagem de *L. major* ao tratamento com drogas genotóxicas. Para isto, células da linhagem selvagem e da linhagem LmHus1+/- foram incubadas com diferentes drogas genotóxicas. A seguir, as drogas foram removidas e as células foram inoculadas em meio sem droga. Conforme resultado apresentado no gráfico no lado esquerdo da Figura 20, a linhagem selvagem apresentou uma redução significativa da densidade de células, até o quarto dia após o tratamento com CPT, HU e MMS, em comparação com as células não tratadas. Depois deste dia, observamos que a densidade celular aumentou gradativamente até o sétimo dia, atingindo níveis comparáveis àquele das células não tratadas. Este dado indica que o estresse genotóxico

é capaz de desencadear a inibição da proliferação celular e sugere a existência de coordenação entre mecanismos de detecção de dano no DNA e controle de ciclo celular.

Em contrapartida, o comportamento das células de LmHus1^{+/-} durante a recuperação do estresse genotóxico foi diferente. Como apresentado no gráfico no lado direito da Figura 20, as células da linhagem LmHus1^{+/-}, tratadas com HU ou CPT, não apresentaram diferença significativa de crescimento quando comparada com as células não tratadas, até o terceiro dia de cultivo. A partir deste dia, no entanto, a densidade celular das culturas de células previamente expostas a HU e CPT foi significativamente menor em comparação as células não tratadas e assim permaneceu por todo o período de dias analisados. O resultado desta análise indica que a habilidade de coordenação entre a detecção de dano no DNA e controle de ciclo celular foi comprometida na linhagem LmHus1^{+/-}. Isto justifica taxas semelhantes de proliferação entre as células LmHus1^{+/-} não tratadas e aquelas tratadas com HU e CPT. Este fenótipo da linhagem LmHus1^{+/-} é análogo ao observado em células de outros eucariotos deficientes de Hus1 (Weiss, Leder et al. 2003) e sugere fortemente o envolvimento de LmHus1 nos mecanismos de coordenação entre checagem da integridade do DNA e progressão do ciclo celular (*checkpoint*). Neste cenário, a redução dos níveis de LmHus1 acarreta em constante acúmulo de lesões na estrutura do DNA, em consequência de não pausarem a divisão celular para reparo das lesões, resultando na inviabilidade das células ou ativação de outros mecanismos de parada de ciclo celular independentes de LmHus1.

Ainda em relação à resposta da linhagem LmHus1^{+/-} ao estresse genotóxico, observamos que o efeito do tratamento com MMS foi, mesmo que mais acentuado, comparável ao efeito do mesmo tratamento em células de linhagem selvagem. A densidade da cultura de células LmHus1^{+/-} previamente expostas ao MMS permaneceu quase constante e significativamente menor em relação as células não tratadas até o sétimo dia de cultivo. A partir do oitavo dia estas células já apresentavam aumento significativo de proliferação, sugerindo sua recuperação do estresse genotóxico. Este dado indica que a habilidade de inibir a divisão celular em resposta ao MMS não foi comprometida na linhagem LmHus1^{+/-}. Isto sugere um envolvimento preferencial de LmHus1 com mecanismos de *checkpoint* ativados pelo estresse replicativo. Enquanto HU e CPT geram estresse replicativo devido à inibição de enzimas necessárias para replicação do DNA, ribonucleotídeo redutase e DNA topoisomerase I, respectivamente, MMS bloqueia fisicamente o progresso da replicação, pois metila o DNA em N⁷-deoxiguanina e N³-deoxiadenina. Este último tipo de dano

desencadeia também a ativação da maquinaria de reparo por excisão de bases ou excisão de nucleotídeos, coordenadas primordialmente por ATM (Kanamitsu and Ikeda 2011).

Juntas, estas informações indicam que o decréscimo dos níveis de LmHus1 compromete a habilidade de células do parasita *L. major* de responder ao estresse genotóxico causado pelo tratamento com HU e CPT e sugere que esta proteína atue em *checkpoints* de resposta ao estresse genotóxico durante a progressão do ciclo celular. Esta hipótese está de acordo com a evidência de associação de LmHus1 com a cromatina em resposta ao tratamento com HU, apresentada na Figura 16C. Com base naqueles dados é concebível que a função *checkpoint* de LmHus1 envolva sua associação direta com as lesões de DNA na forma de fita simples.

3.8. LmHus1 co-Localiza-se com LmRpa1

3.8.1. Identificação de Proteína Homóloga de Rpa1 em *L. major*

A proteína RPA de *H. sapiens* é composta por três subunidades: RPA70, RPA32 e RPA14 (ou Rpa1, Rpa2 e Rpa3). Este complexo trimérico apresenta grande afinidade por DNA na forma de fita simples, *in vitro* e *in vivo* (Wu, Shell et al. 2005), atua como sensor destas lesões na estrutura do DNA e serve como plataforma de recrutamento (veja Figura9 Tabela 2) para outras proteínas envolvidas na resposta e sinalização ao estresse genotóxico. Uma dos primeiros fatores a serem recrutados para sítios de DNA fita simples recobertos por RPA é o complexo 9-1-1 e a interação entre estes dois complexos é essencial para desencadear a resposta e reparo de fitas simples de DNA em eucariotos. Uma proteína homóloga da subunidade 1 (RPA70 ou Rpa1) foi identificada no genoma de *L. amazonensis* e análises bioquímica indicam que LaRpa1 associa-se com fita simples de DNA *in vitro* (Neto, Lira et al. 2007).

Utilizando a sequência de LaRpa1, nós realizamos buscas no genoma de *L. major* a fim de identificar proteínas possivelmente homólogas a Rpa1. Com esta análise, nós identificamos a ORF LmjF28.1820 que codifica um polipeptídeo de 467 aminoácidos (Lm467) com 98.7% de identidade com LaRpa1 (Apêndice J). Nós então submetemos a sequência de Lm467 para análise e classificação pelo banco de dados InterPro. O resultado desta análise está apresentado na Figura 21A e indica que, de

Figura 21. LmHus1 co-Localiza-se com LmRpa1. (A) Representação esquemática da sequência primária de aminoácidos das proteínas Rpa1 de *H. sapiens* (HsRpa1) e de Lm467 (LmRpa1). Os dígitos à direita e esquerda na porção superior de cada proteína referem-se ao número de aminoácidos. As regiões de cada proteína que apresenta homologia com o domínio OB Fold (IPR 01240 – número de cadastro no banco de dados InterPro), característico de proteínas que se associam com ácidos nucleicos, estão representadas como retângulo rosa. **RPA70N** (PF04057 – número de cadastro no Pfam) indica o domínio amino terminal, de HsRpa1, responsável pela associação com Rad9 e ATR (veja representação na Figura 31) (Xu, Vaithiyalingam et al. 2008). **tRNA/helicase-type** (PF01336 – número de cadastro no Pfam) indica domínio também característico de proteínas que se associam a ácidos nucleicos. Observe que LmRpa1 não apresenta uma extensão *upstream* ao domínio tRNA/helicase-type e portanto, não possui região homóloga ao domínio RPA70N de HsRpa1. (B) Análise de *western blotting* de proteínas da fração nuclear (NUC) e citoplasmática (CIT) de linhagem que expressa a proteína LmHus1 em fusão amino terminal com GFP (Green Fluorescent Protein – Proteína Fluorescente Verde – **GFPLmHus1**) (Nunes, Damasceno et al. 2011). A detecção de LmRpa1 foi conduzida com anticorpo anti-LaRpa1 produzido em coelho. A mesma membrana foi sondada com anticorpo anti-GFP (Roche) para controle do fracionamento celular e marcadora da fração nuclear. Os números à esquerda indicam a massa molecular do padrão de massa molecular em kDa. A seta indica a banda com tamanho esperado para a proteína LmRpa1. (C) Análise de imunofluorescência em linhagem superexpressora de LmHus1 tratada com a dose indicada de HU ou não tratada (NT). Para detecção de LmHus1 (em vermelho) foi utilizado anticorpo anti-LmHus1 produzido em camundongo. Para detecção de LmRpa1

forma semelhante a LaRpa1, esta proteína possui três domínios *OB fold*, encontrado nas subunidades de RPA de mamíferos e responsáveis pela associação com o DNA. Dessa forma, concluímos que Lm467 é ortóloga da proteína LaRpa1 e, portanto, possível homóloga de Rpa1 e a denominamos LmRpa1.

3.8.2. Análise da Localização de LmRpa1 em *L. major*

Devido a alta identidade entre LaRpa1 e LmRpa1, nós decidimos testar se anticorpos anti-LaRpa1 (Neto, Lira et al. 2007) seriam eficientes na detecção de LmRpa1 em experimentos de *western blotting*. Para isto, nós testamos este anticorpo em frações nucleares e citoplasmáticas de linhagem expressora de proteína nuclear GFPLmHus1. Conforme dado apresentado na Figura 21B, nós observamos a detecção de uma banda com massa ~51kDa, correspondente a predição de massa molecular para LmRpa1, majoritariamente na fração nuclear. Com base neste dado é possível considerar que anticorpos anti-LaRpa1 são eficientes para detecção de LmRpa1.

Utilizando estes anticorpos, nós conduzimos experimentos de imunofluorescência para checar a localização nuclear de LmRpa1. O resultado desta análise está apresentado na Figura 21C (observe a primeira e segunda coluna) e, em conformidade com o dado de análise de fracionamento celular apresentado acima, LmRpa1 foi detectada principalmente no compartimento nuclear de *L. major*. É necessário ressaltar o perfil distinto de distribuição de LmRpa1 no núcleo do parasita que, na maioria das células, parece estar concentrada na periferia da marcação por DAPI. Este padrão é semelhante àquele observado para LmHus1 em condições de estresse genotóxico (terceira coluna da Figura 21C e Figura 16A). Ao contrário de LmHus1, entretanto, não observamos correlação significativa entre o padrão de distribuição de LmRpa1 e tratamento com HU, o que sugere que esta proteína localiza-

continuação. Figura 21. LmHus1 co-Localiza-se com LmRpa1. (em verde) foi utilizado anticorpo anti-LaRpa1 produzido em coelho (apresentado no item (B)). O DNA nuclear (*n*) e do cinetoplasto (*k*) foram visualizados utilizando DAPI (em azul). Na coluna nomeada como ‘sobreposição’ está apresentado o resultado da sobreposição digital das imagens referentes à LmHus1 e LmRpa1. Na coluna nomeada como ‘aumento’ está apresentado resultado de zoom digital da imagem apresentada na coluna nomeada como sobreposição. A barra branca mostrada na primeira imagem corresponde a 5 µm.

se preferencialmente nas regiões mais periféricas do núcleo. Como discutimos anteriormente, este perfil de localização é condizente com a existência de uma possível concentração de eventos relacionados ao metabolismo de DNA na periferia do núcleo de tripanossomatídeos.

3.8.3. Análise da Associação de LmRpa1 com a Cromatina

Com base no conhecimento de que Rpa1 (assim como LaRpa1) associam-se ao DNA, decidimos investigar se LmRpa1 apresenta a mesma propriedade. Para isto, conduzimos experimentos de *western blotting* para análise de frações ricas em cromatina, da mesma forma que a análise feita para LmHus1. Como apresentamos na Figura 16C, nós observamos que LmRpa1 associa-se com as frações ricas em cromatina de forma proporcional ao tempo de tratamento com HU e dependente de ácido nucleico. É importante destacar que HU inibe a síntese de nucleotídeos, causando estresse replicativo devido ao acúmulo de DNA na forma de fita simples proveniente da replicação incompleta do DNA. Dessa forma, este dado está em conformidade com as análises bioquímicas de LaRpa1 e é um indicativo de que LmRpa1 se associa ao DNA na forma de fita simples *in vivo*. Ainda, este resultado suporta a ideia do envolvimento de LmHus1 com a sinalização e resposta às estruturas de DNA na forma de fita simples.

3.8.4. Análise da Co-localização entre LmHus1 e LmRpa1

Com base nas evidências de que tanto LmRpa1 como LmHus1 se associam à cromatina em resposta ao estresse replicativo causado por HU, nós decidimos examinar se estas duas proteínas se co-localizam no núcleo do parasita *L. major*. Na análise de imunofluorescência, apresentada na Figura 21C, observamos que os sinais correspondentes a LmHus1 e LmRpa1 se sobrepõem parcialmente. Este dado indica que estas duas proteínas se co-localizam em regiões similares ou muito próximas dentro do núcleo e corrobora a ideia de que ambas atuam em mecanismos similares de reconhecimento e sinalização de dano no DNA em *L. major*.

Nós não detectamos mudança significativa da intensidade de co-localização entre estas duas proteínas em função do tratamento com HU. Uma vez que

estas análises foram conduzidas em linhagem superexpressora de LmHus1, esta observação poderia ser indicativa de que a co-localização entre estas duas proteínas fosse apenas um artefato devido ao excesso de LmHus1. Além disso, as dimensões reduzidas do núcleo deste parasita pode comprometer a análise de co-localização por imunofluorescência. Uma alternativa para este problema seria analisar a co-localização entre LmHus1 e LmRpa1 na linhagem selvagem, mas esta abordagem não gerou resultados satisfatórios devido a dificuldade de detecção de LmHus1 endógena (como já discutido). Conforme dado apresentado no Apêndice K, a análise de imunofluorescência de LmHus1 e LmRpa1 na linhagem superexpressora, no entanto, demonstrou que tanto na visão panorâmica quanto lateral das secções focais foi possível observar significativa co-localização entre estas duas proteínas. Portanto, esta análise suporta a ideia de que LmRpa1 e LmHus1 se co-localizam no núcleo de *L. major* e sugere a participação de ambas em processos relacionados.

3.8.5. Análise da Interação entre LmHus1 e LmRpa1

Com base nas observações de co-localização entre LmHus1 e LmRpa1 e também que RPA e o complexo 9-1-1 interagem em outros eucariotos, nós decidimos examinar a existência de interação entre estas duas proteínas em *L. major*. A interação entre o trímero RPA e o complexo 9-1-1 acontece via interação entre as subunidades Rpa1 e Rad9 (veja representação na Figura 32). Sendo assim, a interação que é detectada entre Hus1 e Rpa1 em mamíferos não corresponde a uma interação física direta entre estas duas proteínas, mas sim uma interação mediada por outras proteínas (Wu, Shell et al. 2005).

Então é razoável considerar que se existe interação entre LmRpa1 e um possível complexo 9-1-1 envolvendo LmHus1 seria possível detectar associação entre estas duas proteínas. Para checar esta possibilidade, nós conduzimos experimentos de imunoprecipitação utilizando anticorpos anti-LmHus1 e sondamos LmRpa1 nos produtos desta imunoprecipitação. Apesar de nossos esforços em testar diferentes condições de extração proteica e estresse genotóxico, nós não detectamos nenhuma interação significativa entre estas duas proteínas, conforme o dado apresentado na Figura 22. É importante observar que LmRpa1 possui uma estrutura peculiar quando comparada a sua homóloga humana. Como mostrado na Figura 21A, LmRpa1 é truncada na sua porção amino terminal em relação a HsRpa1. Isto é particularmente

intrigante, pois é nesta região da proteína HsRpa1 que se encontra o domínio RPA70N, responsável pela interação entre Rpa1 e a porção carboxi terminal de Rad9 em eucariotos (Xu, Vaithiyalingam et al. 2008).

Figura 22. Análise da Interação entre LmHus1 e LmRpa1. Análise de *western blotting* (com soro anti-LmHus1 produzido em coelho) de extrato proteico proveniente de linhagem superexpressora de LmHus1 após ser tratada com HU ou não tratada (*NT*). O extrato proteico foi submetido à imunoprecipitação (*IP*) (com soro anti-LmHus1 produzido em camundongo e covalentemente ligado a *beads* de agarose-proteína A (ver detalhes em Material e Métodos). A mesma membrana também foi sondada com anticorpo anti-LaRpa1. *BD* indica experimento controle para interações inespecíficas conduzido com o mesmo extrato proteico na presença das *beads* de agarose-proteína A, mas sem o anticorpo. *AC* indica experimento conduzido sem extrato proteico para controle de bandas provenientes de artefatos devido à ligação do anticorpo nas *beads*. Os números à esquerda indicam a massa molecular do padrão de massa molecular em kDa. Esta imagem é representativa de pelo menos três experimentos independentes.

Dessa forma, a hipótese de que LmRpa1 não possui os requisitos estruturais necessários para estabelecer interação física com complexo 9-1-1 em *L. major*, pode apoiar os resultados negativos das análises de co-imunoprecipitação entre LmRpa1 e LmHus1. Ainda, é preciso considerar a possibilidade de que esta interação, se existe, pode ser transitória ou instável a ponto de ser perturbada durante a precipitação de LmHus1. Assim, nosso conjunto de dados apenas demonstra a co-localização entre estas LmHus1 e LmRpa1 e ainda não podemos tirar conclusão segura sobre a interação física entre estas duas proteínas.

3.9. A ORF LmjF.15.0980 Codifica Uma Proteína Homóloga a Rad9

3.9.1. Busca por Possíveis Homólogos de Rad1 no Genoma de *L. major*

No intuito de encontrar proteínas parceiras de LmHus1 na formação de um possível complexo 9-1-1 em *L. major*, nós utilizamos as sequências das proteínas Rad1 de *H. sapiens*, *S. pombe* e *S. cerevisiae* como iscas em buscas no genoma desta parasita. Conforme tabela apresentada no Apêndice L, a análise das proteínas encontradas nessas buscas, não nos permitiu definir nenhuma proteína obviamente homóloga de Rad1 em *L. major*.

Esta informação pode indicar a inexistência de homólogos de Rad1 no genoma de *L. major* ou, como exemplo da marcada divergência entre Rad9 e Ddc1 (proteína homóloga de Rad9 em *S. cerevisiae*), esta proteína pode apresentar grande divergência em relação a suas correspondentes em outros eucariotos a ponto de mascarar-la em buscas semelhantes às que realizamos. Além disso, erros de anotação e montagem do genoma também podem gerar este tipo de resultado. Para qualquer uma destas possibilidades, abordagens mais diretas, tais como *pull down*, utilizando LmHus1 como isca, seguido de identificação por espectrometria de massa das proteínas associadas, pode ser uma alternativa na busca por uma possível proteína homóloga de Rad1 em *L. major* e precisa ser perseguida.

3.9.2. Análise da Estrutura de Lm718

Em seguida, nós analisamos o genoma de *L. major* no intuito de identificar uma possível proteína homóloga de Rad9. Em nossas buscas, nós identificamos a ORF LmjF15.0980 codificadora de uma proteína com 821 aminoácidos. Entretanto, análises da sequência desta ORF indicaram a existência de um erro de anotação que foi confirmado por dados de *RNAseq* cedidos pelo Dr. Peter J. Myler (*University of Washington*) e disponibilizados no banco de dados *TriTrypDB* (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>; Apêndice L). Com base nesta nova anotação, a ORF LmjF15.0980 codifica uma proteína de 718 aminoácidos (Lm718). Esta proteína apresenta 13,6 e 22,4% de identidade e similaridade, respectivamente, com Rad9 de *H. sapiens* (HsRad9) conforme análise apresentada no Apêndice N.

Nós então submetemos a sequência de aminoácidos predita de Lm718 para análise e classificação pelo banco de dados de famílias proteicas, InterPro. Como apresentado na Figura 23A, a região entre aminoácidos 1 ~ 247 de Lm718 foi identificada como pertencente a família de proteínas Rad9/Ddc1. Nós também observamos que a disposição do trecho pertencente à família Rad9/Ddc1 em Lm718 é

Figura 23. LmRad9 (Lm718) Contém Domínio Homólogo a Proteínas da Família Rad9/Ddc1. (A) Representação esquemática da sequência primária de aminoácidos das proteínas Rad9 de *H. sapiens* (HsRad9) e Lm718. Os dígitos à direita e esquerda na porção superior de cada proteína refere-se ao número de aminoácidos. A região de cada proteína que apresenta homologia com a família Rad9/Ddc1 - (PF04139 – número de cadastro no banco de dados Pfam), de acordo com a identificação realizada no InterPro, está representada como um retângulo rosa. A barra cinza apresentada como uma extensão à direita de cada proteína indica a região não globular na região carboxi terminal de HsRad9 (Navadgi-Patil and Burgers 2009) e Lm718 (de acordo com predição feita por PHYRE 2). As barras verticais na região carboxi terminal de HsRad9 indicam a posição de aminoácidos sabidamente fosforilados em resposta ao dano no DNA. As barras verticais na região carboxi terminal de Lm718 indicam a posição de aminoácidos possivelmente fosforilados, conforme predito pelo servidor NetPhos 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/). (B) Estrutura secundária da região da proteína Lm718 contendo o domínio pertencente à família Rad9/Ddc1, de acordo com predição realizada pelo servidor PHYRE 2. As setas azuis representam folhas beta. Os retângulos verdes representam alfa hélices. (C) Região de alinhamento, obtida com ClustalW, entre região de HsRad9 e Lm718 contendo sítio de fosforilação (tirosina na posição 28 e posição 30 de HsRad9 e Lm718, respectivamente (Yoshida, Wang et al. 2003). Esta tirosina está contida na região da folha beta 2 predita para Lm718, correspondente a região da folha beta 2 de HsRad9.

Figura 24. LmRad9 (Lm718) Possui Estrutura Terciária Semelhante a HsRad9. Representação do modelo estrutural de Lm718 (a esquerda) e HsRad9 (a direita). As alfa hélices **H1**, **H2** e **H3** estão indicadas. As folhas beta **S12** e **S13** também estão indicadas. **IDC loop** (Inter Connecting Domain Loop – Laço de Interconexão entre Domínios). As letras **C** e **N** indicam a região onde se encontram a extremidade carboxílica e amina, respectivamente. Estas representações moleculares foram geradas com PyMol. Para o modelo de HsRad9 foi utilizado o arquivo 3ggr do banco de dados de estrutura de proteínas, PDB (www.rcsb.org/pdb/home/home.do).

semelhante aquela observada na proteína HsRad9. Nesta proteína, o domínio Rad9/Ddc1 é seguido por uma extensão carboxi terminal (aminoácidos 265 – 391) de estrutura predita desordenada/não globular. Coincidentemente, análises de predição estrutural conduzidas no servidor PHYRE, apontam para existência de uma região estruturalmente desordenada na região carboxi terminal de Lm718 (aminoácidos 247-718).

A análise da estrutura secundária predita para Lm718, apresentada na Figura 23B, indica uma similaridade parcial com a estrutura secundária de HsRad9 (veja estrutura secundária de HsRad9 no Apêndice D). Em adição a isto, análise dos sítios de fosforilação de Lm718 e HsRad9, mostrada na Figura 23C, indica a conservação de um sítio de fosforilação de um resíduo de tirosina, contido na segunda folha beta e necessário para função de Rad9 na apoptose (Yoshida, Wang et al. 2003) (Apêndice S). Estas observações nos permite considerar a hipótese de que Lm718 seja homóloga de Rad9 no parasita *L. major*.

Para checar esta possibilidade, nós realizamos a predição da estrutura tridimensional de Lm718 utilizando o servidor PHYRE. A comparação entre o modelo estrutural gerado para Lm718 e a estrutura da proteína HsRad9 está apresentada na Figura 24. É interessante notar que o modelo estrutural gerado para Lm718 indica uma similaridade parcial com HsRad9. Ainda assim, é possível afirmar que o padrão da estrutura terciária de Lm718 é comparável ao de HsRad9. O modelo estrutural de

Lm718 apresenta dois domínios globulares, posicionados nas regiões carboxi e amino terminal, unidos pelo *IDC loop*. O domínio amino terminal, onde é possível identificar as hélices H1 e H2 posicionadas na região correspondente a face interna do complexo 9-1-1, parece ser o mais conservado em relação a HsRad9. Em contrapartida, o domínio carboxi terminal apresenta uma maior divergência estrutural e apenas a hélice H3 e prováveis folhas beta S12 e S13 são identificadas nesta região de Lm718.

É razoável pensar que esta divergência estrutural de Lm718 em relação a HsRad9 seja uma consequência da divergência da estrutura primária desta proteína. Ddc1 é a proteína com sequência primária mais divergente dentre as Rad9 de eucariotos, mas ainda assim, sua função como parte do complexo 9-1-1 de *S. cerevisiae* foi mantida durante a evolução. Sendo assim, a pergunta que passamos a investigar a partir deste ponto é se a função de Lm718 como homóloga de Rad9 foi conservada em *L. major*, pois ao contrário de LmHus1, a divergência na sua sequência primária parece não ter sido atrelada a uma pressão pela conservação da estrutura terciária.

Considerações técnicas a respeito da predição do modelo estrutural de Lm718 também precisam ser apontadas. Estes modelos são usualmente gerados utilizando apenas as regiões que apresentam homologia da sequência primária com outras proteínas de estrutura conhecida. Sendo assim, o modelo estrutural de Lm718 deve ser analisado com cautela pois não considera a contribuição da região predita desordenada para a disposição espacial da proteína. A menos que estruturas de proteínas semelhantes a Lm718, e ainda desconhecidas, sejam determinadas e disponibilizadas para serem usadas como base para geração de modelos estruturais, estudos mais detalhados, como cristalografia, são necessários para melhor compreensão da estrutura desta proteína.

3.9.3. Análise Filogenética de Lm718

Ainda que as análises estruturais de Lm718 sugiram que esta proteína seja homóloga de Rad9, nós decidimos investigar sua relação evolutiva com as subunidades do complexo 9-1-1 e PCNA de outros eucariotos, e por em prova a sua possível homologia com Rad9. A análise da filogenia destas proteínas está apresentada no filograma da Figura 13 e, com base nela, é possível agrupar Lm718 e seus ortólogos em *L. infantum* e *L. braziliensis* na mesma ramificação que contêm as subunidades Rad9 do

Figura 25. Expressão Heteróloga de LmRad9 e Teste de Anticorpo Anti-LmRad9. (A) Representação esquemática da construção resultante (pET28a6XHisLmRad9) da clonagem da ORF LmjF15.0980 (LmRad9) no vetor pET28a. **ATG**: região codificadora do códon de iniciação de tradução da cauda contendo repetição com seis resíduos de Histidina (**6XHis**). **SCM**: sítio de clonagem múltiplo. **Ori** e **Origem f1**: Origem de Replicação. **KAN**: região contendo o gene codificador da proteína que confere resistência a kanamicina em *E. coli*. As linhas tracejadas indicam a posição aproximada dos sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas nelas indicadas. Estas enzimas foram empregadas para análise apresentada no item (B). **pb**: pares de bases. (B) Eletroforese de produtos de digestão da construção apresentada no item (A). As enzimas utilizadas estão indicadas em cada amostra. **M**: marcador de tamanho de DNA. Os números à esquerda indicam o tamanho dos fragmentos de DNA de **M** em Kb. (C) Análise de SDS-PAGE em gel 12% de amostras de proteína provenientes de bactéria *E. coli* da linhagem B121 transformada com a construção apresentada no item (A). **M**: marcador de massa molecular de proteínas. Os números à esquerda indicam as massas molares das proteínas de **M** em kDa. **NI**: não induzido. **IN**: induzido com 0.5 mM IPTG. **P**: precipitado – fração insolúvel do extrato proteico. **S**: solúvel – fração solúvel do extrato proteico (ver detalhes em Material e Métodos). A seta à direita indica a banda correspondente ao tamanho molecular esperado para a proteína 6XHisLmRad9. O gel foi corado com *comassie-blue*. (D) Análise de western blotting (com soro anti-LmRad9 produzido em coelho e purificado por afinidade) de extrato total de linhagem selvagem (**WT**) e linhagem superexpressora de LmRad9 (**pXGRad9**; linhagem apresentada na Figura 26). O asterisco indica uma banda inespecífica e serve, neste experimento, como controle de quantidade de proteína de cada amostra analisada. A seta a direita indica a banda correspondente ao tamanho molecular esperado para a proteína LmRad9. Os números à esquerda indicam a massa molecular do padrão de massa molecular em kDa.

complexo 9-1-1 de eucariotos. É possível observar também que Lm718 é filogeneticamente mais próxima aos homólogos de Rad9 de eucariotos do que Ddc1 e, de forma semelhante a LmHus1, é mais provável que tenha evoluído a partir do processo de seleção que originou as subunidades do complexo 9-1-1 em eucariotos do que a partir dos processos seletivos que moldaram os trímeros envolvidos na replicação. Em concordância com o que nós observamos para LmHus1, é aceitável considerar que Rad9, e possivelmente o complexo 9-1-1, também surgiu na linhagem eucariótica em algum momento anterior a divergência dos tripanossomatídeos.

Em síntese, com base neste conjunto de informações nós permitimos considerar Lm718 como possível homóloga de Rad9 em *L. major*. E por isto a denominamos LmRad9.

3.10. LmRad9 Localiza-se no Núcleo de *L. major*

3.10.1. Expressão Heteróloga de LmRad9 e Produção de Anticorpos Anti-LmRad9

Com o objetivo de gerar ferramentas para a caracterização funcional de LmRad9, nós clonamos a ORF LmjF15.0980 no vetor pET28a para criar uma fusão amino terminal de LmRad9 com uma sequência de seis resíduos histidina (pET28a6XHisLmRad9), conforme apresentado na Figura 25A. Esta construção foi digerida com enzimas de restrição e o padrão de bandas resultante desta digestão corresponde ao esperado como indica a análise de eletroforese mostrada em Figura 25B (*Bpu*1102I: 5313, 1518 e 698 pb. *Nhe*I: 7037 e 492 pb). Então, nós transformamos bactérias com a construção pET28a6XHisLmRad9 para expressar a fusão 6XHisLmRad9. Na Figura 25C, está representada a análise de SDS-PAGE onde é possível observar o aparecimento de uma banda com massa molecular esperada (~74 kDa) para 6XHisLmRad9, na fração insolúvel de extratos de bactérias induzidas com IPTG. Tendo em vista a possibilidade de empregar 6XHisLmRad9 em ensaios de *pull down*, para identificação de possíveis proteínas parceiras ou testar sua interação com LmHus1 e LmRpa1, nós tentamos obter quantidades suficiente desta proteína em sua forma nativa através de diferentes condições de indução e extração. Nenhuma de nossas

tentativas foi bem sucedida e, pelo menos para este propósito, não foi possível utilizar 6XHisLmRad9.

A proteína 6XHisLmRad9 na forma insolúvel foi então empregada para produção de anticorpo anti-LmRad9 em coelhos. Para verificar a especificidade deste anticorpo, nós o utilizamos em experimentos de *western blotting* em extratos de linhagem selvagem de *L. major* e linhagem superexpressora de LmRad9 (apresentada na Figura 26 e Apêndice O). O resultado desta análise, apresentado na Figura 25D, demonstrou que o anticorpo anti-LmRad9 reconhece de forma específica uma proteína com massa molecular (~73 kDa) condizente com aquela predita para LmRad9. Nós também conduzimos experimentos de imunoprecipitação para avaliar a eficácia destes anticorpos neste tipo de experimento. No entanto, pelo menos nas condições testadas, eles não se mostraram eficientes para precipitar LmRad9 a partir de extratos do parasita.

3.10.2. Análise da Localização Subcelular de LmRad9

Com o objetivo de investigar a localização subcelular de LmRad9, nós utilizamos anticorpos anti-LmRad9 em experimentos de imunofluorescência em células de *L. major* do tipo selvagem. Como apresentado no Apêndice P, através desta abordagem foi possível identificar apenas uma proporção muito pequena de células nas quais o sinal de LmRad9 concentrava-se majoritariamente no compartimento nuclear do parasita. Além disso, o sinal obtido era em geral muito fraco e difuso por toda a célula. Para contornar este problema, nós geramos uma linhagem do parasita, superexpressora de LmRad9. Esta tarefa envolveu a clonagem da ORF LmjF15.0980 no vetor de expressão pXG1, conforme mostrado na Figura 26A. A análise da construção resultante desta clonagem com enzimas de restrição indicam que o gene foi corretamente clonado no vetor, de acordo com o perfil de eletroforese mostrado na Figura 26B. Sendo assim, a construção pXG1LmRad9 foi transfectada em células de linhagem selvagem de *L. major* e a análise de *western blotting* apresentada na Figura 26C indica que a linhagem resultante (pXGRad9) possui níveis aumentados da proteína LmRad9.

Em seguida, nós realizamos experimentos de imunofluorescência nesta linhagem utilizando os anticorpos anti-LmRad9. O resultado desta abordagem foi condizente com aqueles obtidos nos experimentos conduzidos com a linhagem selvagem. Na Figura 26D, é possível observar que LmRad9 é majoritariamente

concentrada no núcleo de *L. major*. Outra observação possível através dessa análise é que LmRad9, assim como LmHus1 (em condições de estresse genotóxico) e LmRpa1, parece concentrar-se nas bordas da marcação nuclear de DAPI. Esta disposição, que parece não ser significativamente afetada pelo estresse genotóxico (Apêndice Q), indica uma localização preferencial de LmRad9 na periferia nuclear e serve como mais suporte a ideia da existência de um subcompartimento nuclear especializado em metabolismo de DNA em *Leishmania*.

3.11. Linhagem de Células que Superexpressam LmRad9 Apresenta Defeito de Crescimento

A partir da disponibilidade da linhagem superexpressora de LmRad9, nós decidimos investigar o efeito da superexpressão desta proteína no crescimento do parasita *L. major*. Para isto, comparamos os perfis de proliferação de linhagem selvagem e pXGRad9. O resultado desta análise está apresentado no gráfico da Figura 27 e indica que a linhagem pXGRad9 apresentou densidade de células significativamente menor em comparação com a linhagem selvagem, entre segundo e sexto dia de cultivo. Em contraste ao observado para a linhagem LmHus1+/- (Figura

continuação. Figura 26. LmRad9 Localiza-se no Núcleo de *L. major*. *blotting* (com soro anti-LmRad9 produzido em coelho e purificado por afinidade) de extrato total de linhagem selvagem (*WT*) e linhagem superexpressora de LmRad9 (*pXGRad9*). Uma linhagem transfectada com o vetor pXG1 vazio também foi incluída na análise para controle de possíveis variações dos níveis de LmRad9 em função da presença de DNA extracromossomal. A mesma membrana foi sondada com anticorpo anti-GAPDH para controle da quantidade de proteína de cada amostra analisada. Os números à esquerda indicam a massa molecular do padrão de massa molecular em kDa. Os números na porção inferior da imagem representam a densitometria da banda correspondente a LmRad9, conforme análise conduzida com software ImageJ. Esta imagem é representativa de pelo menos três experimentos independentes com dois clones distintos. **(D)** Análise de imunofluorescência em linhagem superexpressora de LmRad9. Para detecção de LmRad9 (em vermelho) foi utilizado anticorpo anti-Rad9 produzido em coelho e purificado por afinidade. O DNA nuclear (*n*) e do cinetoplasto (*k*) foi visualizado utilizando DAPI (em azul). Na coluna nomeada como ‘sobreposição’ está apresentado o resultado da sobreposição digital das imagens referentes à LmHus1 e ao DNA. Na coluna nomeada como ‘aumento’ está apresentado o resultado de zoom digital da imagem apresentada na coluna nomeada como sobreposição. A barra branca mostrada na primeira imagem corresponde a 5 µm. Estas imagens são representativas de pelos menos três experimentos independentes.

18), essa menor densidade nas culturas de pXGRad9 sugere um atraso no processo de divisão celular nesta linhagem. Repare que no sétimo dia de cultivo, a cultura da linhagem pXGRad9 apresenta densidade comparável a linhagem selvagem, sugerindo a finalização do processo que inibia a divisão celular.

Figura 27. Linhagem de Células que Superexpressa LmRad9 Apresenta Defeito de Crescimento. Comparação do perfil de crescimento entre linhagem selvagem (círculos brancos) e linhagem superexpressora de LmRad9 (círculos pretos). As células foram inoculadas na mesma concentração (2×10^5 células/ml) e mantidas nas mesmas condições de cultivo. A densidade de células foi examinada a cada 24 horas. As barras representam o desvio padrão. Este gráfico é representativo de pelo menos quatro experimentos independentes com dois clones distintos.

Este comportamento da linhagem pXGRad9 difere do que foi observado para a linhagem superexpressora de LmHus1, que não apresenta defeito aparente de proliferação. Observações experimentais indicam que em mamíferos a função de Hus1 no controle da progressão do ciclo celular concentra-se na fase S (Weiss, Leder et al. 2003) enquanto que Rad9 atua não somente nos processos de controle inerentes da fase S, mas também da fase G2 (Pandita, Sharma et al. 2006). Com base nisso, é possível dizer que a diferença de toxicidade resultante da superexpressão de LmHus1 ou LmRad9 em *L. major*, seja devida a funções distintas de cada uma no controle da progressão do ciclo celular neste parasita. Além disso, nós observamos que a linhagem superexpressora de LmHus1 (Figura 17C), selecionada com $8 \mu\text{g/ml}$ de G418, apresenta níveis de LmHus1 comparáveis aos níveis de LmRad9 na linhagem pXGRad9 (Figura 26C; ~5 vezes de aumento em relação aos níveis na linhagem selvagem) selecionada com $100 \mu\text{g/ml}$ de G418. Esta observação sugere que a expressão de LmRad9 requer

controle mais restritivo em comparação a LmHus1, de forma condizente com a diferença de efeito da superexpressão de cada uma destas proteínas.

3.12. Linhagem de Células que Superexpressa LmRad9 Apresenta Sensibilidade Aumentada ao MMS

No intuito de obter mais informações sobre a função de LmRad9 em *L. major*, nós fizemos a comparação entre a proliferação relativa da linhagem pXGRad9 e linhagem controle (transfectada com vetor vazio) cultivadas em diferentes concentrações de HU ou MMS. No gráfico apresentado do lado esquerdo da Figura 28 está representado o que observamos quando as células foram cultivadas na presença de HU. De acordo com esta análise nós não detectamos diferença significativa entre estas duas linhagens, em nenhuma das concentrações de HU empregada. Este dado diverge do que observamos para o comportamento da linhagem superexpressora de LmHus1 em relação a HU. Como discutimos em publicação prévia (Nunes, Damasceno et al. 2011), é possível que LmHus1 seja expressa em níveis que a torne uma subunidade limitante do funcionamento de um possível complexo 9-1-1. Devido a esta razão, sua superexpressão tenha um efeito positivo na eficiência do complexo 9-1-1 para sinalizar e responder ao estresse genotóxico. Mas este não parece ser o caso de LmRad9, pois, pelo menos em relação a HU (e também CPT; Apêndice R), sua superexpressão não alterou a habilidade do parasita em lidar com o estresse replicativo.

Nós então decidimos avaliar o efeito da superexpressão de LmRad9 na resposta ao estresse genotóxico causado pelo MMS. Como discutimos anteriormente, o estresse genotóxico devido à ação de MMS é resultado não apenas de estresse replicativo, mas também dos danos nas bases nitrogenadas, que ativam a maquinaria de reparo por excisão de bases ou por excisão de nucleotídeos. O estresse genotóxico causado por HU e CPT, por sua vez, pode ser considerado como resultado principal do estresse replicativo. Surpreendentemente, o gráfico apresentado no lado direito da Figura 28 demonstra que a linhagem pXGRad9 apresentou significativa redução da proliferação relativa na presença de MMS. Este resultado indica que a superexpressão de LmRad9, em comparação com a linhagem controle, causa aumento da sensibilidade deste parasita ao estresse genotóxico causado pela metilação de bases. Este dado também difere do efeito da superexpressão de LmHus1, que confere resistência ao MMS, e serve como mais uma indicação de que estas proteínas podem desempenhar

funções em aspectos distintos da resposta ao dano no DNA em *L. major*. Este dado sugere ainda que LmRad9 pode desempenhar função relacionada ao processamento de bases danificadas como nas vias de excisão de bases ou excisão de nucleotídeos. Esta

Figura 28. A Superexpressão de LmRad9 Causa Aumento de Sensibilidade ao MMS. Comparação entre a proliferação relativa de células transfetadas com o vetor pXG1 vazio (círculos brancos) e superexpressora de LmRad9 (círculos pretos). As células foram inoculadas na mesma densidade (2×10^5 células/ml) em meio de cultivo contendo as concentrações indicadas de HU (gráfico a esquerda) ou MMS (gráfico a direita). A densidade de células em cada condição foi determinada após 96 horas de incubação com as drogas. A proliferação celular está expressa como uma porcentagem da densidade de células tratadas com HU ou MMS em relação às células que não foram tratadas. As barras representam o desvio padrão. Os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre proliferação relativa da linhagem com vetor vazio e da linhagem superexpressora de LmRad9. O nível de significância foi determinado através de *teste-t* não pareado com valores de *p* correspondendo a 0.026 (*), 0.0037 (**), 0.014 (***) e 0.0056 (****). Estes gráficos são representativos de três experimentos independentes para cada uma das drogas.

hipótese encontra suporte nas observações, apresentadas na Introdução, de que proteínas do complexo 9-1-1 interagem e estimulam proteínas reparadoras de danos no DNA.

É válido considerar também que, em células humanas, Rad9 promove apoptose através da interação com as proteínas BCL-2 e BCL-x_L e sua superexpressão também causa morte celular em resposta ao MMS (Komatsu, Miyashita et al. 2000). Análise da sequência de LmRad9 permitiu identificar uma região similar ao domínio de ligação de Rad9 com proteínas antiapoptose (Apêndice S). A presença deste domínio em HsRad9 é uma exclusividade desta subunidade em relação as demais proteínas do

complexo 9-1-1. Por consequência, a conservação do mesmo em LmRad9 (Figura 23C) suporta substancialmente a sua homologia com HsRad9. O termo ‘apoptose’ é usado para designar o conjunto de mecanismo envolvido na morte celular programada, característico de metazoários. A existência ou função de ‘apoptose’ em organismos unicelulares, tais como tripanossomatídeos, é assunto de investigação (Castanys-Munoz, Brown et al. 2012). Com base nisto, a existência deste domínio em LmRad9, similarmente a SpRad9 (Komatsu, Hopkins et al. 2000), pode revelar pistas do processo evolutivo da apoptose mediado por Rad9 e também ajudar no entendimento das funções de LmRad9 no parasita *L. major*.

3.13. LmRad9 Interage com LmHus1 *in vivo*

3.13.1. Análise da Conservação dos Resíduos de Interação entre LmHus1 e LmRad9

No contexto do complexo 9-1-1, HsRad9 e HsHus1 estabelecem interação através de suas regiões carboxi terminal e região amino terminal, respectivamente (Figura 10). No Apêndice A, está representada uma visão mais detalhada dos resíduos envolvidos nesta interação que envolve a hélice H3 de Rad9 e H2 de Hus1. Nós decidimos analisar se os resíduos de HsRad9 envolvidos nesta interação foram conservados em LmRad9. Devido a alta divergência da sequência primária de LmRad9, especialmente da região carboxi terminal (veja alinhamento no Apêndice N), não foi possível identificar com segurança quaisquer resíduos de LmRad9 possivelmente envolvidos na interação com Hus1. Sendo assim, analisamos em LmHus1 a conservação dos resíduos de HsHus1 envolvidos na interação com HsRad9. Conforme apresentado na Figura 29A, três resíduos de aminoácidos envolvidos na interação HsHus1-HsRad9 foram claramente conservados em LmHus1, inclusive em contextos topológicos semelhante ao de HsHus1. A conservação destes resíduos, indica que eles possam ser determinantes para disposição espacial de LmHus1 em um possível complexo com uma proteína homóloga de HsRad9. Esta observação também está de acordo com a discussão onde sugerimos que a divergência da sequência primária de LmHus1 foi determinada e

Figura 29. LmRad9 Interage com LmHus1 *in vivo*. (A) Região de alinhamento, obtida com ClustalW, entre regiões de LmHus1 e Hus1 de *S. pombe* (SpHus1) e *H. sapiens* (HsHus1) contendo resíduos envolvidos na interação com Rad9 (lisina 93; valina 129 e prolina 134 de HsHus1). (B) Região de alinhamento, obtida com ClustalW, entre regiões de LmHus1, SpHus1 e HsHus1 contendo resíduos envolvidos na interação com Rad1 (valina 169; isoleucina 176; leucina 198; valina 199 e fenilalanina 205 de HsHus1). Nos itens (A) e (B), as estruturas secundárias contidas nas regiões analisadas de HsHus1 e LmHus1 estão indicadas na parte superior e inferior de cada bloco de alinhamento, respectivamente. As setas azuis representam folhas beta. Os retângulos verdes representam alfa hélices. (C) Análise de *western blotting* de Produtos de imunoprecipitação (IP) conduzida com anticorpo anti-LmHus1 produzido em camundongo. Extrato proteico foi obtido de linhagem selvagem de *L. major* tratada com 10µM CPT, 10mM HU ou não tratada (NT). Os produtos de imunoprecipitação foram analisados por *western blotting* com anticorpo anti-LmHus1 produzido em coelho e purificado por afinidade. A mesma membrana foi sondada com anticorpo anti-LmRad9 produzido em coelho e purificado por afinidade. O painel denominado **LmRad9 (superexposição)** representa exposição prolongada ao filme, da membrana sondada com anticorpo anti-LmRad9, para visualização de bandas menos abundantes reconhecidas pelo anticorpo. Anticorpo anti-GAPDH também foi utilizado para sondar a mesma membrana como controle da quantidade de proteína contida nas amostras de cada situação analisada. Os números à esquerda indicam a massa molecular do padrão de massa molecular em kDa. Esta imagem é representativa de três experimentos independentes.

limitada pela estrutura terciária. Por fim, este dado suporta, pelo menos em relação a sequência primária, a existência de uma possível interação entre LmHus1 e LmRad9.

Nós também analisamos se os resíduos de HsHus1 envolvidos na interação com HsRad1 foram conservados em LmHus1. Em células de humano esta interação acontece entre resíduos da hélice H3 e folha beta S13 de HsHus1 e resíduos da hélice H2 e folha beta S9 de HsRad1 (Apêndice A). Como representado na Figura 29B, estes resíduos foram parcialmente conservados em LmHus1 semelhante ao que observamos para SpHus1. Este dado pode indicar que, como em *S. pombe*, as mutações nestes resíduos podem não ter comprometido as interações estabelecidas por eles, especialmente no caso das mutações conservativas. Por outro lado, é preciso considerar que não encontramos proteínas obviamente homólogas de Rad1 no genoma de *L. major*. Sendo assim, a divergência dos resíduos de LmRad9 envolvidos na interação com Rad1 pode suportar a hipótese da inexistência, se não de um homólogo para Rad1, da interação entre estas duas proteínas.

3.13.2 Análise da Interação entre LmHus1 e LmRad9

Para validar a existência da interação entre LmHus1 e LmRad9, conforme sugerida pela análise apresentada acima, nós realizamos experimento de co-imunoprecipitação com anticorpo anti-LmHus1 em extratos de proteínas do parasita *L. major*. Com base na análise de *western blotting* desse experimento, apresentada na Figura 29C, observamos que LmRad9 é co-precipitada com LmHus1. Além disso, nós observamos que o tratamento prévio das células com CPT ou HU resultou na co-precipitação de outras bandas reconhecidas pelo anticorpo anti-LmRad9, sugerindo modificações pós traducionais na estrutura de LmRad9.

Este dado indica que LmHus1 e LmRad9 formam um complexo *in vivo* que responde ao estresse genotóxico. Em eucariotos superiores Rad9 é alvo de fosforilações, em resposta ao dano no DNA, cuja função inclui, por exemplo, a indução de apoptose e regulação da permanência do complexo 9-1-1 nos sítios de DNA lesionado. A maioria das fosforilações de Rad9 ocorre em resíduos localizados em sua região carboxi terminal não globular. As análises que apresentamos na Figura 23A e Figura 23C indicam a existência de possíveis sítios de fosforilação também na região carboxi terminal de LmRad9. Com base nisso, é possível considerar que as modificações que detectamos em LmRad9 em resposta ao estresse genotóxico correspondam a

fosforilação desta proteína. No entanto, a validação experimental para esta hipótese se faz necessária. É preciso ressaltar que estas formas modificadas de LmRad9 são detectadas na fração coprecipitada com LmHus1. Nós não observamos quantidades detectáveis destas formas, ou o aparecimento delas em resposta ao dano no DNA, no extrato total de proteínas, uma indicação de que estas elas existem preferencialmente quando associadas a LmHus1.

Finalmente, o resultado desta análise dá mais sustentação para a hipótese de que LmRad9 seja homóloga de HsRad9 e sugere fortemente a existência de um complexo homólogo ao complexo 9-1-1 em *L. major*. Com base nos nossos dados podemos inferir que este complexo, composto pelo menos pelas proteínas LmHus1 e LmRad9, está envolvido em mecanismos de resposta ao estresse genotóxico neste parasita. Não sabemos ainda se estas duas proteínas são as únicas subunidades deste complexo e a elucidação da composição e estrutura e composição é essencial para o entendimento dos mecanismos de sua função.

3.14 LmRad9 co-Localiza-se com LmRpa1

Nós também decidimos analisar se LmRad9 e LmRpa1 co-localizam-se em resposta ao dano no DNA. Para isso, conduzimos experimentos de imunolocalização com anticorpos anti-LmRad9 e anti-LaRpa1 em células submetidas ao tratamento com HU. Com base no resultado desta análise, apresentado na Figura 30, nós observamos que existe uma co-localização parcial entre estas duas proteínas. Apesar de que no exemplo de LmHus1 e LmRpa1 a co-localização parece ser mais significativa do que entre LmRad9 e LmRpa1, esta análise pode sugerir o envolvimento destas duas proteínas em mecanismos semelhantes de sinalização e resposta ao estresse genotóxico.

Entretanto, é preciso enfatizar que esta diferença de intensidade de co-localização também está em conformidade com as diferenças entre os fenótipos de superexpressão de LmHus1 e LmRad9. Ela suporta a ideia de que estas duas proteínas possam desempenhar funções distintas nos mecanismos de resposta ao estresse genotóxico, além das funções em comum, que requerem a formação do complexo entre elas. Além disso, este dado também remonta e reforça a observação da ausência do domínio RPA70N em LmRpa1. Em conclusão, nossas observações sugerem que o mecanismo e a regulação da função de LmRad9, assim como do complexo que forma com LmHus1, apresenta peculiaridades em comparação aos seus homólogos em outros eucariotos.

Figura 30. LmRad9 Co-localiza-se com LmRpa1. Análise de imunofluorescência em linhagem superexpressora de LmRad9 tratada com 10mM HU. Para detecção de LmRad9 (em vermelho) foi utilizado anticorpo anti-LmRad9 produzido em camundongo. Para detecção de LmRpa1 (em verde) foi utilizado anticorpos anti-LaRpa1 produzido em coelho. O DNA nuclear (*n*) e do cinetoplasto (*k*) foram visualizados utilizando DAPI (em azul). Na coluna nomeada como ‘sobreposição’ está apresentada o resultado da sobreposição digital das imagens referentes à LmRad9 e LmRpa1. Na coluna nomeada como ‘aumento’ está apresentado resultado de zoom digital da imagem apresentada na coluna nomeada como sobreposição. A barra branca mostrada na primeira imagem corresponde a 5 μ m.

3.15 A Redução dos Níveis de LmHus1 Compromete a Associação de LmRpa1 com a Cromatina

Baseado nos dados de co-localização apresentados na Figura 21C e Apêndice K, é razoável considerar não somente uma interação física entre LmHus1 (ou do correspondente complexo 9-1-1 em *L. major*) e LmRpa1, como também uma interação funcional. Sob esta perspectiva, decidimos examinar a dinâmica da associação de LmRpa1 com a cromatina, em resposta ao estresse genotóxico, na linhagem LmHus1^{+/-}. Para isto, nós realizamos experimentos de *western blotting* em frações de cromatina de células de linhagem selvagem e da linhagem LmHus1^{+/-} submetidas ao tratamento com HU. Conforme apresentado na Figura 31A, o resultado desta análise indica que, na linhagem selvagem, a associação de LmRpa1 com a cromatina atinge o nível máximo entre duas e quatro horas de tratamento com HU. Na linhagem LmHus1^{+/-}, no entanto, mesmo em seis horas de tratamento com HU os níveis de LmRpa1 na fração de cromatina não atingiram a saturação observada na linhagem selvagem. Uma possível explicação para esta diferença poderia ser devido a redução dos

níveis totais de LmRpa1 na linhagem LmHus1^{+/-}. Para checar esta possibilidade nós fizemos a comparação entre os níveis desta proteína na linhagem selvagem e LmHus1^{+/-} através de análise de western blotting. De acordo com o dado apresentado na Figura 31B, nós não detectamos diferença significativa entre o nível total de LmRpa1 na linhagem selvagem e LmHus1^{+/-} e podemos concluir que a diferença observada reflete uma perturbação intrínseca da dinâmica de associação de LmRpa1 à cromatina.

Figura 31. A Redução dos Níveis de LmHus1 Compromete a Associação de LmRpa1 com a Cromatina. (A) Análise de *western blotting* de frações celular rica em cromatina preparadas a partir de linhagem selvagem (*WT*) e de linhagem deficiente em LmHus1 (*LmHus1*^{+/-}) (a mesma metodologia do experimento apresentado na Figura 16C; para mais detalhes consultar Material e Métodos). As células foram expostas a HU pelos tempos indicados antes de serem fracionadas. A detecção de LmRpa1 foi conduzida com anticorpo anti-LaRpa1 produzido em coelho. A mesma membrana foi sondada com anticorpo anti-HistonaH2A para controle da quantidade de proteína das amostras de frações rica em cromatina. Esta imagem é representativa de dois experimentos independentes. (B) Análise de *western blotting* de extrato de proteínas totais de linhagem selvagem (*WT*) e linhagem deficiente em LmHus1 (*LmHus1*^{+/-}). A detecção de LmRpa1 foi conduzida com anticorpo anti-LaRpa1 produzido em coelho. Uma banda inespecífica reconhecida pelo anticorpo anti-LaRpa1 está mostrada e serve, neste experimento, como controle da quantidade de proteína das amostras analisada. Os números à esquerda indicam a massa molecular em kDa do padrão de massa molecular.

Portanto, este dado indica que a redução dos níveis de LmHus1 perturba a associação de LmRpa1 com a cromatina em resposta ao estresse replicativo causado por HU. A luz das observações experimentais em modelos de eucariotos superiores, este dado é particularmente intrigante. De acordo com o modelo estabelecido em células de mamíferos (Figura 9) RPA é o primeiro fator que se associa aos trechos de DNA na forma de fita simples e participa no recrutamento de outros fatores, entre eles o complexo 9-1-1. Sendo assim, é esperado que RPA seja determinante para a associação do complexo 9-1-1 no sítio da lesão e não há evidências experimentais que suportem a hipótese da existência de uma ordem de eventos contrária a esta. Entretanto, nosso dado sugere que em *L. major*, a regulação das etapas iniciais do reconhecimento de danos no DNA por LmRpa1, depende do estabelecimento da resposta via LmHus1. Sob essa perspectiva, se houver depleção de LmHus1 a resposta ao dano não será eficientemente estabelecida mesmo se os níveis de LmRpa1 não forem alterados.

Figura 32. Modelo das Etapas Iniciais de Reconhecimento e Sinalização de Dano no DNA em Eucarioto. (A) A subunidade Rpa1 se associa às regiões de DNA fita simples. O domínio RPA70N, contido no domínio OB Fold (ver Figura 21A), estabelece interações com outras proteínas sensores de dano no DNA, incluindo Rad9. Esta associação acontece via associação do domínio RPA70N com a extensão não globular da região carboxi terminal de Rad9. Esta interação ajuda a manter proteínas sinalizadoras de dano no DNA, tais como o complexo 9-1-1, no local da lesão no DNA. Desta forma, a resposta celular ao dano, como por exemplo, a parada do ciclo celular e recrutamento de proteínas de reparo de DNA, são garantidos e perpetuados pelo tempo necessário para o reparo da lesão. Muitas outras proteínas estão envolvidas neste processo (veja exemplos na Figura 9 e Figura 8), mas foram omitidas para simplificação. (B) Representação de um possível cenário envolvendo LmRpa1, LmHus1 e LmRad9 em *L. major*. Os pontos de interrogação indicam proteínas ou aspectos desconhecidos neste cenário: não sabemos se há interação entre LmRpa1 e LmRad9 (ou qualquer outra subunidade do complexo 9-1-1 de *L. major*) e também não sabemos se há e quais são as outras proteínas que compõem o complexo 9-1-1 deste parasita.

Durante o estresse replicativo, RPA se associa aos trechos de fita simples de DNA e facilita a associação do complexo 9-1-1 na extremidade 5' da junção fita dupla/fita simples de DNA. Esta montagem não apenas desencadeia a sinalização para parada do ciclo celular, mas também garante a parada e estabilização das forquilhas de replicação até que a perturbação seja eliminada. À luz deste modelo, nosso dado também sugere que a redução dos níveis de LmHus1 comprometeu a estabilização e parada da forquilha de replicação em resposta ao estresse genotóxico. Sendo assim, a redução dos níveis de LmRpa1 na cromatina pode ser interpretada com uma consequência de dissociação do DNA, a medida que a replicação prossegue. Este fenótipo é compatível com uma possível função de LmHus1 na estabilização das forquilhas de replicação durante o estresse replicativo em *L. major*.

Esta hipótese é consistente com os dados apresentados na Figura 20. A diminuição dos níveis de LmHus1 compromete o controle da replicação celular pelas vias dependente de LmRpa1. Os danos acumulados por este descontrole podem resultar na inviabilidade celular ou danos secundários que ativam outros mecanismos de parada do ciclo celular, como observamos a partir do quarto dia. Em adição aos dados da Figura 16C e Figura 21C, estes dados sugerem que LmHus1 e LmRpa1 cooperam entre si para o funcionamento dos mecanismos de reconhecimento de estruturas de fita simples de DNA e estabilização de forquilhas de replicação durante o estresse genotóxico neste parasita.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conjunto de abordagens que utilizamos neste trabalho nos permitiu observar o envolvimento de LmHus1, LmRad9 e LmRpa1 na resposta e sinalização ao dano no DNA do parasita *L. major*. Em primeiro lugar, nós observamos que as proteínas LmHus1 e LmRad9 são estruturalmente e filogeneticamente relacionadas às subunidades do complexo 9-1-1 de outros eucariotos. Segundo, análise fenotípica de linhagens com alterações nos níveis de LmHus1 ou LmRad9 indicam o requerimento destas proteínas para a resposta apropriada ao estresse genotóxico. Em terceiro lugar, experimentos de co-imunoprecipitação demonstram a formação de complexo, responsivo ao estresse genotóxico, entre LmHus1 e LmRad9. Em quarto e último lugar, experimentos de imunolocalização e isolamento de cromatina indicam que o papel de LmHus1 na resposta ao estresse genotóxico pode envolver sua associação com os sítios de DNA lesionado, co-localização e cooperação com LmRpa1.

A relação filogenética entre LmHus1 e LmRad9 e componentes do complexo 9-1-1 de outros organismos sugere que estas proteínas evoluíram a partir de uma grampo primitivo, existente antes da divergência dos tripanossomatídeos. Este grampo ancestral deve ter sido a base para evolução das maquinarias de resposta ao estresse replicativo encontradas nas diferentes linhagens eucarióticas. As peculiaridades estruturais de LmRad9 e a ausência de um homólogo óbvio de Rad1 no genoma de *L. major*, evidencia que as subunidades individuais deste heterotrímero seguiram cursos distintos durante a evolução e, portanto, sustenta a especialização de cada subunidade. Entender a evolução, estrutura e função do complexo 9-1-1 nos eucariotos deste grupo é particularmente instigante, uma vez que a forma de lidar com o estresse genotóxico, e consequentemente com a plasticidade genômica, foi determinante para o estabelecimento das especializações moleculares marcantes que estes parasitas possuem. Por exemplo, a manutenção de um genoma concatenado no compartimento mitocondrial, a geração profícua de amplicons em algumas espécies de *Leishmania* e a habilidade de realizar variação antigênica em *T. brucei*.

A ausência do domínio RPA70N em LmRpa1 sugere que a interação entre esta proteína e o heterotrímero 9-1-1, do modo como conhecida nos eucariotos superiores, surgiu depois da divergência dos tripanossomatídeos. Ainda não sabemos se esta interação é estabelecida em *L. major*, em caso afirmativo, a pergunta crucial é como ela acontece. É possível que uma proteína adaptadora medeie esta interação ou

que o domínio carboxi terminal de LmRad9, que é relativamente estendido, compense a redução da porção amino terminal de LmRpa1. Possíveis implicações destes cenários também afetam diretamente a forma como este parasita lida com a plasticidade genômica, pois em eucariotos superiores esta interação é essencial para estabelecimento da resposta ao dano no DNA, via ATR.

Baseado nisto, é tentador considerar que as divergências estruturais de LmRpa1 e Lm9-1-1 desempenham função central para estabelecimento de um mecanismo peculiar de resposta ao estresse genotóxico. Os modelos de amplificação gênica presumem a ocorrência de estruturas de DNA na forma de fita simples e quebras da dupla fita do DNA (Figura 10). Uma maquinaria de sinalização de danos como conhecemos em eucariotos superiores, detectaria e repararia prontamente tais estruturas, interrompendo prematuramente os eventos de amplificação gênica. Condizente com isto, a amplificação gênica em células cancerosas pode ser correlacionada com mutações em proteínas de *checkpoint* e reparo de DNA, tais como p53 e BRCA2. Sendo assim, é concebível a ideia de que as proteínas de resposta e sinalização de danos no DNA de *L. major* co-evoluíram para garantir a plasticidade genômica necessária para tolerar a amplificação gênica.

Nossos dados indicam que a diminuição dos níveis de LmHus1 afeta significativamente a resposta ao estresse replicativo causado por HU e CPT. Isto sugere que esta proteína seja requerida para eventos de *checkpoint* que ocorrerem, possivelmente, durante a fase S do ciclo celular. A superexpressão de LmRad9, no entanto, não resultou em alteração significativa da resposta a HU e CPT, mas causou aumento de sensibilidade a MMS. Isto sugere que LmRad9 pode estar envolvida não somente com a resposta ao estresse replicativo, mas também com as vias de reparo de bases danificadas. Outras análises experimentais, como obtenção de mutante nulo para LmRad9, se fazem necessárias para investigar se a ação desta proteína é restrita a fase S do ciclo celular ou estende-se à fase G2. Juntos, estes dados suportam o envolvimento destas proteínas no controle da progressão do ciclo celular em resposta ao estresse genotóxico.

A conservação estrutural de LmHus1 sugere que esta subunidade encontra-se sob maior pressão seletiva para preservação de sua estrutura, quando comparada com LmRad9. Em concordância com esta observação, os fenótipos decorrentes da redução dos seus níveis são condizentes com as funções atribuídas a Hus1 na manutenção dos telômeros e controle do ciclo celular em eucariotos superiores. Baseado nisso, podemos

pensar que a manutenção das funções mínimas do complexo 9-1-1 requereu a preservação da estrutura tridimensional de Hus1. A divergência das outras subunidades pode evidenciar um processo de adaptação entre o complexo 9-1-1 e a plasticidade genômica neste parasita. Uma pergunta ainda não respondida diz respeito ao requerimento da existência do complexo entre LmHus1 e LmRad9 para as funções individuais de cada uma destas subunidades. Não sabemos se o efeito de LmHus1 nos telômeros de *L. major* requer a associação de LmRad9, como em mamíferos onde esta função é desempenhada pelo complexo 9-1-1. Também não determinamos ainda se LmRad9 é requerida para a função *checkpoint* de LmHus1. Em contrapartida, a conservação da interação entre estas duas proteínas é um indício de que elas atuem de modo cooperativo, pelo menos em parte de suas funções, e apoia substancialmente a existência de um homólogo do complexo 9-1-1 neste parasita. A possível fosforilação de LmRad9 parece acontecer apenas no contexto do complexo 9-1-1, sugerindo que a função desta modificação está relacionada com a associação entre estas duas proteínas e possivelmente com suas funções no contexto deste complexo.

Em conclusão, nossos dados suportam a existência de mecanismos de reconhecimento e resposta ao estresse genotóxico em *Leishmania*. De forma geral, estes mecanismos parecem atuar na coordenação entre detecção de danos no DNA e controle da progressão do ciclo celular (como modelo apresentado na Figura 8). De modo interessante, pelo menos parte da maquinaria envolvida nesta resposta também atua na manutenção dos telômeros, uma evidência de que a co-evolução entre maquinaria de resposta aos danos no DNA e funcionamento dos telômeros iniciou-se antes da divergência dos tripanossomatídeos. A elucidação da composição e arquitetura do complexo 9-1-1 em *L. major*, assim como do seu modo de associação com as estruturas de lesão de DNA, faz-se essencial para entender as bases moleculares da resposta ao estresse genotóxico e plasticidade genômica neste parasito.

4.13 CONCLUSÕES

- LmHus1 e LmRad9 são estruturalmente e felogenicamente relacionadas as subunidades do complexo 9-1-1 de eucariotos.
- LmHus1, LmRad9 e LmRpa1 localizam-se no núcleo de *L. major*.
- LmHus1 e LmRad9 co-localizam-se parcialmente com LmRpa1 no núcleo de *L. major*.
- LmHus1 e LmRpa1 associam-se com a cromatina em resposta ao estresse genotóxico.
- LmHus1 é requerida para a proliferação do parasita *L. major*.
- LmHus1 se associa com sequências teloméricas de *L. major*.
- LmHus1 participa da manutenção de telômeros em *L. major*.
- LmHus1 participa da parada da proliferação celular em resposta a HU e CPT.
- A superexpressão de LmRad9 causa defeito de proliferação do parasita *L. major*.
- A superexpressão de LmRad9 causa aumento da sensibilidade a MMS.
- LmRad9 e LmHus1 formam um complexo *in vivo*.

5 APÊNDICES

Apêndice A. Resíduos Envolvidos na Interface de Interação Entre as Subunidades do Complexo 9-1-1 Humano. Representação do cristal do complexo 9-1-1. Nos retângulos em destaque estão representados os resíduos envolvidos nas interações estabelecidas entre as subunidades. Esta figura foi gerada com imagens previamente publicadas (Young *et al. J. Mol. Biol.* 2009. 390, 490-502. doi:10.1016/j.jmb.2009.05.028)

Apêndice B. Número de Acesso para as Sequências Utilizadas na Figura 13.

Proteína	Organismo	Número
9-1-1		
Hus1		
Sp	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2330760
ScMec3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	90405345
Hs	<i>Homo sapiens</i>	49168588
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>	17137664
Ce	<i>Caenorhabditis elegans</i>	351060639
Xl	<i>Xenopus laevis</i>	148234380
Lm	<i>Leishmania major</i>	157869604
Lb	<i>Leishmania braziliensis</i>	154337756
Li	<i>Leishmania infantum</i>	146087049
Rad1		
Sp	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	809601
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1051278
Hs	<i>Homo sapiens</i>	3289000
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>	17137690
Ce	<i>Caenorhabditis elegans</i>	15717886
Xl	<i>Xenopus laevis</i>	148233614
Rad9		
Sp	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5032
ScDdc1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6325062
Hs	<i>Homo sapiens</i>	4759022
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>	21357905
Ce	<i>Caenorhabditis elegans</i>	7671224
Xl	<i>Xenopus laevis</i>	147905155
Lm	<i>Leishmania major</i>	157866914
Lb	<i>Leishmania braziliensis</i>	389600763
Li	<i>Leishmania infantum</i>	134068529
PCNA		
Heterotrimeric		
sul1	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	15897339
mes1	<i>Metallorphaera sedula</i>	146304996
aep1	<i>Aeropyrum pernix</i>	14600497
stm	<i>Staphylothermus hellenicus</i>	1297527058
pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>	18977355
pya1	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	18313780
sul2	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	15897331
mes2	<i>Metallorphaera sedula</i>	146302836
aep2	<i>Aeropyrum pernix</i>	14601898
stm2	<i>Staphylothermus marinus</i>	126465899
sul3	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	15897914
mes3	<i>Metallorphaera sedula</i>	146304555
aep3	<i>Aeropyrum pernix</i>	118431047
pya2	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	18312128
Homotrimeric		
tha	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	16081965
Ap	<i>Apis mellifera</i>	110764909
Bt	<i>Bos taurus</i>	77735939
Dr	<i>Danio rerio</i>	18859223
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>	17136790
Gg	<i>Gallus gallus</i>	45383776
Hs	<i>Homo sapiens</i>	4505641
Lb	<i>Leishmania braziliensis</i>	154334688
Li	<i>Leishmania infantum</i>	146082203
Lm	<i>Leishmania major</i>	157867016
Mm	<i>Mus musculus</i>	7242171
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6319564
Sp	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	19113296
Xl	<i>Xenopus laevis</i>	148235535

Apêndice C. Alinhamento Entre Sequência de Aminoácidos de LmHus1, SpHus1 e HsHus1. O alinhamento foi obtido com ClustalW. Asteriscos (*) indicam resíduos totalmente conservados entre as sequências. Dois pontos (:) indicam substituições que conservaram a característica funcional do resíduo. Um ponto (.) indica substituição com fraca conservação da característica funcional do aminoácido. Na tabela abaixo do alinhamento está apresentado o agrupamento dos resíduos de acordo com suas funções químicas. Esta classificação, assim como o código para as conservações, são válidos para todos os alinhamentos apresentados ao decorrer deste Apêndice.

HsHus1	MKFR	AKIV	DGAC	LNHF	TRIS	NMIA	KLAK	TCTL	RI	SP	DK	LN	FILC	DK	LANG	GV	SM	WC	EL	EQ	60	
SpHus1	MRFK	TRIS	N---	LY	TL	RL	VQ	AL	DK	IG	RF	CL	RL	MP	ET	VN	FV	IV	PD	FR	55	
LmHus1	MRFK	ATLK	D---	AK	GL	GV	LQ	VC	RS	IQR	DC	IV	RL	Q	SER	IR	FF	SNT	NAAD	56		
	*	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:		
HsHus1	EN	FF	NE	FQ	ME	GV	SA	EN	NE	IY	LE	LT	SE	NS	RL	AK	TA	QN	-----	AR	111	
SpHus1	ET	IF	ED	YV	VQ	--	SN	AD	VN	IN	LE	VP	ID	NF	YK	AL	RS	AA	-----	AS	105	
LmHus1	S	FL	FY	EM	VC	DS	GY	DE	HS	IT	CE	VL	DL	AQ	LI	HV	KQ	AE	AR	ES	116	
	.	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:		
HsHus1	CL	TV	SV	EL	LS	MS	SS	SS	RI	VT	HD	IP	IK	VI	PR	KL	WK	DL	Q	EP	171	
SpHus1	LL	SL	ST	TW	SG	RA	FG	SN	IV	TH	NI	PV	RV	LS	Q	SV	YV	SV	IK	EP	165	
LmHus1	L	WR	V	A	M	Q	G	L	S	G	Q	P	D	--	V	S	F	D	V	P	173	
	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:		
HsHus1	K	M	K	N	-----	I	S	NH	L	V	I	E	A	N	-----	L	D	G	-----	-----	192	
SpHus1	K	Y	K	S	-----	L	S	D	R	I	I	M	S	A	N	-----	M	S	G	-----	186	
LmHus1	K	L	K	N	T	A	A	D	S	V	T	F	S	A	R	V	L	M	P	P	233	
	*	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:		
HsHus1	K	I	E	T	L	V	C	V	T	T	H	F	K	D	L	G	-	N	P	L	A	243
SpHus1	S	V	N	I	P	S	A	R	V	S	T	K	W	K	L	E	-	N	P	E	L	244
LmHus1	Y	A	E	H	F	M	A	R	F	S	L	K	Y	E	A	V	E	L	V	E	Q	293
	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:		
HsHus1	Q	V	N	P	T	K	A	L	C	N	I	V	N	N	K	M	V	H	F	D	L	280
SpHus1	S	S	V	A	K	R	V	I	A	C	F	C	E	G	H	A	L	V	L	Y	V	287
LmHus1	K	E	L	D	P	M	K	S	M	Y	L	V	D	R	R	A	L	V	L	S	V	331
	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:		

Resíduo	Cor	Propriedade
AVFPMILW	VERMELHO	Pequeno/Hidrofóbico/Aromáticos(exceto Y)
DE	AZUL	Ácido
RK	ROSA	Básico (exceto H)
STYHCNGQ	VERDE	Hidroxil, sulfidril, amina (inclui G)

Apêndice D. Representação da Estrutura Secundária de HsHus1 e HsRad9. As flechas amarelas representam folhas beta. As barras vermelhas representam alfa hélices. Esta representação foi construída com base no arquivo 3ggr disponível em *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

Apêndice E. Análise de Imunofluorescência com Anticorpo Anti-LmHus1 na Linhagem Selvagem de *L. major*. No painel a esquerda está representada marcação com soro de camundongo retirado antes da imunização com GSTLmHus1. A seta aponta região nuclear desprovida de sinal de fluorescência. No painel a direita está representada marcação com soro anti-LmHus1, na qual a região nuclear apresenta emissão de fluorescência. Descontando-se marcação citoplasmática, possivelmente devida a reconhecimento inespecífico, é possível inferir que a fluorescência nuclear, no painel à direita, indica a localização de LmHus1 no núcleo.

Apêndice F. Análise de Imunofluorescência com Anticorpo Anti-LmHus1 em Células Submetidas ou Não a Estresse Genotóxico. **A)** Imagens de secções confocal de células submetidas ou não a tratamento com HU. Cada linha de imagens corresponde a uma secção confocal (enumeradas, para fins ilustrativos, como $z = 1 - 4$, de acordo com a representação em (A)). Observe que nas fatias das células não tratadas, não se detecta relocação de LmHus1 para a periferia. Nas células expostas a HU, é possível distinguir o padrão de relocação de LmHus1 em pelo três fatias ($z = 1$ até $z = 3$). Esta análise indica que os padrão de distribuição de LmHus1, observado na secção confocal individual, corresponde ao padrão de distribuição tridimensional desta proteína. **B)** Representação da *secção* de célula, gerada durante aquisição de imagens em microscópio confocal. A imagem gerada para cada fatia corresponde a visão panorâmica de um observador situado na extremidade, oposta ao ponto zero, do eixo z . **C)** Núcleos marcados com DAPI de células expostas ou não a HU. As imagens foram tiradas do painel mostrado em (B). A comparação entre as duas condições evidencia uma distribuição diferente do DNA. Nas células que sofreram estresse genotóxico, a marcação de DAPI não se apresenta difusa como nas células saudáveis, mas parece concentrada na periferia nuclear. *Continua na próxima página.*

continuação **Apêndice F. Análise de Imunofluorescência com Anticorpo Anti-LmHus1 em Células Submetidas ou Não a Estresse Genotóxico.**

Apêndice G. Caracterização da Linhagem LmHus1^{+/-}. **A)** Representação esquemática do locus genômico de LmHus1 e do cassete de expressão utilizado para interromper a cópia selvagem do gene. Este esquema é idêntico ao apresentado na **Figura 17A**, exceto que as posições de anelamento dos *primers* utilizados na análise do item (B) estão indicadas como **a**, **b**, **c** e **d**. **B)** Análise de PCR de DNA genômico extraído de células da linhagem selvagem (WT), LmHus1^{+/-} e linhagem controle (H2) transfectada com plasmídeo contendo o cassete LmHus1::Neo**SAT*. Os *primers* utilizados são aqueles indicados no item (A). Imagem retirada da tese de doutorado gerada no âmbito do projeto *FAPESP 07/55728-8*. **C)** Análise de *Southern blotting* dos cromossomos das linhagens selvagem (WT) e LmHus1^{+/-} separados por PFGE de corrida curta. O painel da esquerda representa o gel corado com brometo de etídio antes de ser processado para análise. O painel da direita representa resultado da análise, realizada com as sondas para *SAT* ou *Hus1*. C indica a região de compressão dos cromossomos. A seta no painel correspondente a marcação com *SAT* indica o sinal de detecção na região de compressão. Nenhum epissomo foi detectado nesta análise, indicando que o cassete LmHus1::Neo**SAT* foi integrado no genoma. **D)** Comparação do perfil de crescimento entre linhagem LmHus1^{+/-} (clones C2 e C3; na presença (+) ou ausência (-) da droga de seleção) e células selvagens. O resultado demonstra que o defeito de crescimento de LmHus1^{+/-} não é devido a ausência da marca de resistência para a droga de seleção.

Apêndice H. LmHus1 e Telômeros. **A)** Análise dos cromossomos das linhagens selvagem (WT) e LmHus1^{+/-} separados por PFGE de corrida longa. Nenhuma diferença entre os cariótipos destas duas linhagens foi detectada nesta análise. **B)** Análise de *northern blotting* de amostra de RNA extraído de linhagem selvagem (WT) e LmHus1^{+/-}. Fragmento de DNA contendo repetição telomérica foi utilizado como sonda. O arraste corresponde à população de RNAs contendo repetições teloméricas (TERRA) está indicado. Observe que a intensidade na linhagem LmHus1^{+/-} é significativamente maior em comparação a WT. Asteriscos indicam a região do rDNA (~2.0 kb). O painel inferior representa a visualização com brometo de etídio das bandas do rDNA das amostras. **C)** Modelo de um possível cenário envolvendo LmHus1 e funcionamento dos telômeros em *L. major*. LmHus1 inibe a transcrição de TERRA pela RNA polimerase e a telomerase fica ativa para sintetizar repetições teloméricas. Na deficiência de LmHus1, TERRA é transcrito e inibe a atividade telomerase. Neste caso, os telômeros podem sofrer encurtamento.

Apêndice I. Análise da Proliferação Relativa da Linhagem LmHus1+/- na Presença de Drogas Genotóxicas. Comparação entre proliferação relativa da linhagem selvagem (WT) e LmHus1+/- cultivadas na presença das drogas genotóxicas indicadas. A proliferação está expressa como porcentagem de células sobreviventes em relação as células não tratadas. Observe que não houve diferença significativa de proliferação entre as duas linhagens em nenhuma condição analisada.

Apêndice J. Alinhamento Entre Sequência de Aminoácidos de LmRpa1 e LaRpa1. O alinhamento foi obtido com ClustalW. Os números de acesso destas sequencias no NCBI são *A4R84278.1* e *XP_001684464.1* para LaRpa1 e LmRpa1, respectivamente.

```

LmRpa1 MQQFGSHQIQPIDSLTPFLGGKWWIRARVTDKTDIRTWNKPTSQGKLFSTFLIDESAAIR 60
LaRpa1 MQQFGSHQIQPIDSLTPFLGGKWWIRARVTDKTDVRTWNKPTSQGKLFSTFLIDESAAIR 60
*****:*****

LmRpa1 ATVFNDAVDTFEPLIVNGQVYYFSGGQVKNNANRRFSNVNNDYELTFDRSSEIMLARQDTS 120
LaRpa1 ATVFNDAVDTFEPLIVNGQVYYFSGGQVKNNANRRFSNVNNDYELTFDRSSEIMLARQDTS 120
*****

LmRpa1 TAALPMQRYNFVPIELLKQREVGSLVDVLGVVLKVDEVSSITQKSTGRELMKRNVMGDM 180
LaRpa1 TAALPMQRYNFVPIELLKQREVGSLVDVLGVVLKVDEVSSITQKSTGRELVKRNVMGDM 180
*****:*****

LmRpa1 TAAVEVTFWNDEAKAWCFVPGTVVALRQLKVGSGFDGVTLSSTYQTKIDINPTDLPDVKKL 240
LaRpa1 TAAVEVTFWNDEAKAWCFVPGTVVALRQLKVGSGFHGVFPSSSTYQTKIDINPTDLPDVKKL 240
*****:*****

LmRpa1 ATWYVATGGANVTSLSQQGLGAASGAGGESDRGRKYLDEIQSEGIGRGLKPEYVDVRCVP 300
LaRpa1 ATWYVTTGGANVMSLSQQGLGAASGAGGESDRGRKYLDEIQSDGIGRGLKPEYVDVRCVP 300
*****:*****

LmRpa1 IYFKQDAQWYDACPTCNKKVTEEGAQGDRFRCEKCDKTVTPTQRYLVSIQVIDNVSQAWL 360
LaRpa1 IYFKQDAQWYDACPTCNKKVTEEGAQGDRFRCEKCDKTVTPTQRYLVSIQVIDNVSQAWL 360
*****

LmRpa1 TLFNEAGIEFFGMEAAELKRRAQEDPLYIAKLAQGRMNRFPVVMRLRVKEEMSSNSMTGEE 420
LaRpa1 TLFNEAGIEFFGMEAAELKRRAQEDPLYIAKLAQGRMNRFPVVMRLRVKEETSSNAMTGEE 420
*****:*****

LmRpa1 SDRLRMSVVRISSEFMPIAGTSEETRRRLAQNLRTCEDEILRLIEAYV 467
LaRpa1 SDRLRMSVVRISSEFMPIAGTSEETRRRLAQNLRTCEDEILRLIEAYV 467
*****

```

Apêndice K. Análise da co-Localização entre LmHus1 e LmRpa1. Análise confocal de imunofluorescência com os anticorpos indicados. A região do núcleo está delimitada pela linha azul. A imagem mostrada corresponde à visão panorâmica de uma secção confocal (veja ilustração no *Apêndice F*). As linhas tracejadas brancas indicam a região onde foi feito um corte transversal. A imagem da visão lateral na região desta corte é mostrada nos retângulos do lado direito e inferior. Observe que deste ângulo também é possível observar colocalização significativa entre LmHus1 e LmRpa1.

Apêndice L. Resultado de Busca por Rad1 no Genoma de *L. major*

ORF	InterPro	TriTrypDB
LmjF07.0070	NR	Proteína Hipotética
LmjF07.0990	PF03066	Proteína Nucleolar Ligante de RNA
LmjF07.1000	NR	Proteína Ligante de RNA
LmjF18.1630	SSF47473	Proteína Hipotética
LmjF31.0220	NR	
LmjF31.0920	NR	Proteína de Resistência ao Estibogluconato de Sódio
LmjF31.0930		
LmjF31.0950		
LmjF31.0960		
LmjF34.2420	PF00534	Glicosil Transferase
LmjF36.1400	PF11527	Proteína Hipotética
LmjF36.1600	PF0027	Subunidade alfa 1 do Proteassoma

ORF refere-se ao número de acesso no banco de dados TriTrypDB; **InterPro** refere-se a classificação da ORF de acordo com análise pelo servidor InterPro; **TriTrypDB** refere-se a classificação da ORF no banco de dados TriTryp; ***NR**: Nenhum Registro

Apêndice N. Alinhamento Entre Sequência de Aminoácidos de LmRad9 e HsRad9. O alinhamento foi obtido com ClustalW. Os números de acesso destas sequencias estão indicados no *Apêndice B*.

LmRad9	MSLQFTVSGPNIRVLLSILTCVSRIGDAVYIVGLSDGIEISAVSPGRNGHIAVRVHKRCF	60
HsRad9	--MKCLVTGGNVKVLGKAVHLSRIGDELYLEPLEDGLSLRTVNSSRSAYACFLFAPLFF	58
	:: *:* *::** . : .::*:** ::* *.**::: :*...*::: . . . *	
LmRad9	DRFLLELPSSRRSGADDGSGLATSDAAAEGRADDAGADGPKPYLCILLTKTLVATVLRQHNT	120
HsRad9	QQYQAATP-----GQDLLRCKILMKSFSLSVFRSLAM	89
	::: * * . * : . . :*:*	
LmRad9	NVQSLDFQYRTAESSDSAAAAAASDAGNDSADADQCLWKGRITDADVVRWHCTYARSLTK	180
HsRad9	LEKTVEKCCISLN-----GRSSRLVVQLHCKFG--VRK	120
	:::: : : **:. **:*:***. : *	
LmRad9	TFLRLAEGEPTSVYADLSYRFEVCGDARAYGSLLASLPSSANQCALTLPESGGLELRS	240
HsRad9	THNLSFQDCESLQAVFDPASCPHMLRAPARVLGEAVLPFSPALAEVTLGIGRGRVILRS	180
	*. * : : *. . . * : . : . **. *. : .::: : :*: : . . : ***	
LmRad9	VRQAGSSSSSSSSAAAAAASGRESGSAAAPSGNIRAADGSSTVVTAFFESTFTLFRFFEP	300
HsRad9	YHEEEADS--TAKAMVTMCLGEED-----FQQLQAQEG-VAITFCLKEFRGLLSFAES	231
	:: :.* ::.* .: . **.* :*: * :.: .::: *: * *.	
LmRad9	AASPSATDADGAAMVTEYGPSEVPQTFFPHTPPPPPPPPPQQQSPRRDSVLSAPDPAPSA	360
HsRad9	ANLNLSIHFD-----APGRPAIFTIKD-----	253
	* : . *	
	: * * :*: *	
LmRad9	TVTAGFIPLPGKITFDVKPFKNAAWLAELQGVQLHLLTGEEMPIIIASITPEEVQKRRRIA	420
HsRad9	-----SLLDG----HFVLATLSDTDSHSQDLG	276
	** * :*:*: : : : .	
LmRad9	SSGVMLARHESLPGTGGAGARPFLVINNAPSVVPAPISFILYVAALDSAPSGGRASGSG	480
HsRad9	SP---ERHQFVP-----	285
	*. **:::*	
LmRad9	GAPGGAADTSIATAISSAVNTPRPSTHQRTLKGDGGAPAAVAATPTPGYGDGENGERDGM	540
HsRad9	-----QLQAHSTPHP-----	295
	. * .**:*	
LmRad9	PVSSGNSITSGTLSHVEASFASTNAATAAAGMVGRLSRESNNTVGSAYATPRPTASPSDL	600
HsRad9	-----DDFANDDIDSYMIAMETTIGNEGSRVLPISISLSPGPQPPKS--	336
	.**.: : *. :..*...: * :* * . . *	
LmRad9	VMVMTGGDTPGTRSGDAGGVHAARKSVDFLTGVTASSLPMNSAVAMTGAAPPASLPPSP	660
HsRad9	-----PGPHSEEE-----DEAEPSTV	352
	**.:* : . : *.:	
LmRad9	SHTPTATALNSMYPLDFEAFVRTYTSANEVGEEDAQDAELREFLASCVASMSRGPTQN	718
HsRad9	PGTTPPKKFRSLFFGSILAPVRSPQGPSVLAEDSEGE-----	391
	. **... :*: : : * ** : . . . * **::.	

Apêndice O. Análise da Superexpressão de LmRad9. Análise de *northern blotting* de amostra de RNA extraído de linhagem selvagem (WT) e pXGRad9 selecionada em G418 (100µg/ml). Fragmento de DNA contendo repetição a ORF LmjF15.0980 foi utilizado como sonda. A banda correspondente ao tamanho do transcrito esperado (~2.6 kb) está indicada pela seta e está mais intensa na linhagem superexpressora. O painel em tom azul à esquerda e na região inferior da imagem representam a visualização das bandas do marcador de tamanho de RNA (M) e rRNA, respectivamente. Esta visualização foi obtida pela coloração da membrana com azul de metileno.

Apêndice P. Análise de Imunofluorescência com Anticorpo Anti-LmRad9 na Linhagem Selvagem. Proteína LmRad9 (vermelho) visualizada na linhagem selvagem. As setas no painel a esquerda indicam núcleos com acentuada intensidade de fluorescência, em relação ao restante da célula. No painel a direita, célula com predominância de fluorescência no compartimento nuclear, visualizada individualmente. DNA do núcleo (n) e do cinetoplasto (k) estão marcados em azul. Com base nesta análise é possível inferir que LmRad9 também se localiza no núcleo de células selvagens.

Apêndice Q. Análise de Imunofluorescência com Anticorpo Anti-LmRad9 em Células Submetidas ou Não a Estresse Genotóxico. LmRad9 (vermelho) visualizada na linhagem pXGRad9 tratada ou não com CPT. DNA do núcleo (n) e do cinetoplasto (k) estão marcados em azul. Observe que não há diferença significativa do padrão de distribuição de LmRad9 no núcleo entre as condições analisadas.

Apêndice R. Análise da Proliferação Relativa da Linhagem pXGRad9 na Presença de CPT. Comparação entre proliferação relativa da linhagem controle com vetor vazio (pXG) e linhagem pXGRad9 cultivadas na presença de CPT. A proliferação está expressa como porcentagem de células sobreviventes em relação as células não tratadas. Observe que não houve diferença significativa de proliferação entre as duas linhagens no intervalo de concentração analisado.

Apêndice T. A Linhagem LmHus1+/- Apresenta Alterações na Metaciclogênese. Durante a caracterização da linhagem LmHus1+/- nós observamos que a mesma apresentava uma elevada proporção de células agrupadas em rosetas. Também observamos que estas células parecem mais alongadas, semelhante a formas metacíclicas de *L. major*. Decidimos verificar se esta morfologia celular correspondia com alteração na metaciclogênese. A avaliação foi realizada por aglutinação com lectina de amendoim, exatamente como descrito na literatura (Cunningham *et al. Science. 2001. 292 (5515), 285-287*). O resultado está apresentado no gráfico abaixo e sugere que a porcentagem de células metacíclicas em cultura é inversamente proporcional a expressão de LmHus1. Se estes fenótipos representam uma relação biológica entre LmHus1 e efetividade, não sabemos ainda. Mas eles indicam que a expressão de LmHus1 afeta a estrutura da superfície celular. Isto poderia ser a causa dos experimentos de transfecção na linhagem LmHus1+/- não terem sido bem sucedidos.

Apêndice U. Publicações

Genetica (2010) 138:301–311
DOI 10.1007/s10709-009-9406-7

A transposon toolkit for gene transfer and mutagenesis in protozoan parasites

Jeziel D. Damasceno · Stephen M. Beverley ·
Luiz R. O. Tosi

Molecular & Biochemical Parasitology 177 (2011) 65–69

Contents lists available at ScienceDirect

Molecular & Biochemical Parasitology

Short communication

The Hus1 homologue of *Leishmania major* encodes a nuclear protein that participates in DNA damage response

Vinicius S. Nunes^{a,1}, Jeziel D. Damasceno^{a,1}, Raimundo Freire^b, Luiz R.O. Tosi^{a,*}

* Corresponding author. Tel.: +55 16 36023117; fax: +55 16 36331786.
E-mail address: luitosi@fmrp.usp.br (L.R.O. Tosi).

¹ These authors are equal contributors and are randomly listed.

LmHus1 rabbit polyclonal serum detected a protein that migrated with the expected molecular mass of approximately 40 kDa in wild type (WT) cells, which is overexpressed in the LmHus1 cell line. The same band was detected after immunoprecipitation that used

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Augusto, M. J., F. M. Squina, J. F. Marchini, F. C. Dias and L. R. Tosi (2004). "Specificity of modified *Drosophila* mariner transposons in the identification of *Leishmania* genes." Exp Parasitol 108(3-4): 109-113.
- Badie, S., J. M. Escandell, P. Bouwman, A. R. Carlos, M. Thanasoula, M. M. Gallardo, A. Suram, I. Jaco, J. Benitez, U. Herbig, M. A. Blasco, J. Jonkers and M. Tarsounas (2010). "BRCA2 acts as a RAD51 loader to facilitate telomere replication and capping." Nat Struct Mol Biol 17(12): 1461-1469.
- Bao, S., T. Lu, X. Wang, H. Zheng, L. E. Wang, Q. Wei, W. N. Hittelman and L. Li (2004). "Disruption of the Rad9/Rad1/Hus1 (9-1-1) complex leads to checkpoint signaling and replication defects." Oncogene 23(33): 5586-5593.
- Basenko, E., Z. Topcu and M. J. McEachern (2011). "Recombination can either help maintain very short telomeres or generate longer telomeres in yeast cells with weak telomerase activity." Eukaryot Cell 10(8): 1131-1142.
- Bermudez, V. P., L. A. Lindsey-Boltz, A. J. Cesare, Y. Maniwa, J. D. Griffith, J. Hurwitz and A. Sancar (2003). "Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A 100(4): 1633-1638.
- Besteiro, S., R. A. Williams, G. H. Coombs and J. C. Mottram (2007). "Protein turnover and differentiation in *Leishmania*." Int J Parasitol 37(10): 1063-1075.
- Beverley, S. M. (1991). "Gene amplification in *Leishmania*." Annu Rev Microbiol 45: 417-444.
- Boothroyd, C. E., O. Dreesen, T. Leonova, K. I. Ly, L. M. Figueiredo, G. A. Cross and F. N. Papavasiliou (2009). "A yeast-endonuclease-generated DNA break induces antigenic switching in *Trypanosoma brucei*." Nature 459(7244): 278-281.
- Calderano, S. G., P. D. de Melo Godoy, M. C. Motta, R. A. Mortara, S. Schenkman and M. C. Elias (2011). "*Trypanosoma cruzi* DNA replication includes the sequential recruitment of pre-replication and replication machineries close to nuclear periphery." Nucleus 2(2): 136-145.
- Cano, M. I., J. M. Dungan, N. Agabian and E. H. Blackburn (1999). "Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa." Proc Natl Acad Sci U S A 96(7): 3616-3621.
- Caspari, T., M. Dahlen, G. Kanter-Smoler, H. D. Lindsay, K. Hofmann, K. Papadimitriou, P. Sunnerhagen and A. M. Carr (2000). "Characterization

- of *Schizosaccharomyces pombe* Hus1: a PCNA-related protein that associates with Rad1 and Rad9." Mol Cell Biol 20(4): 1254-1262.
- Castanys-Munoz, E., E. Brown, G. H. Coombs and J. C. Mottram (2012). "Leishmania mexicana metacaspase is a negative regulator of amastigote proliferation in mammalian cells." Cell Death Dis 3: e385.
- Cuadrado, M., B. Martinez-Pastor, M. Murga, L. I. Toledo, P. Gutierrez-Martinez, E. Lopez and O. Fernandez-Capetillo (2006). "ATM regulates ATR chromatin loading in response to DNA double-strand breaks." J Exp Med 203(2): 297-303.
- Curtin, N. J. (2012). "DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target." Nat Rev Cancer 12(12): 801-817.
- Damasceno, J. D., S. M. Beverley and L. R. Tosi (2010). "A transposon toolkit for gene transfer and mutagenesis in protozoan parasites." Genetica 138(3): 301-311.
- David, M., I. Gabdank, M. Ben-David, A. Zilka, I. Orr, D. Barash and M. Shapira (2010). "Preferential translation of Hsp83 in Leishmania requires a thermosensitive polypyrimidine-rich element in the 3' UTR and involves scanning of the 5' UTR." RNA 16(2): 364-374.
- David, S. S., V. L. O'Shea and S. Kundu (2007). "Base-excision repair of oxidative DNA damage." Nature 447(7147): 941-950.
- Delacroix, S., J. M. Wagner, M. Kobayashi, K. Yamamoto and L. M. Karnitz (2007). "The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1." Genes Dev 21(12): 1472-1477.
- Deng, Z., J. Norseen, A. Wiedmer, H. Riethman and P. M. Lieberman (2009). "TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres." Mol Cell 35(4): 403-413.
- Dias, F. C., J. C. Ruiz, W. C. Lopes, F. M. Squina, A. Renzi, A. K. Cruz and 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): 667-676.
- Didier, N., C. Hourde, H. Amthor, G. Marazzi and D. Sassoon (2012). "Loss of a single allele for Ku80 leads to progenitor dysfunction and accelerated aging in skeletal muscle." EMBO Mol Med 4(9): 910-923.

- Dionne, I., R. K. Nookala, S. P. Jackson, A. J. Doherty and S. D. Bell (2003). "A heterotrimeric PCNA in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*." Mol Cell 11(1): 275-282.
- Dore, A. S., M. L. Kilkenny, N. J. Rzechorzek and L. H. Pearl (2009). "Crystal structure of the rad9-rad1-hus1 DNA damage checkpoint complex--implications for clamp loading and regulation." Mol Cell 34(6): 735-745.
- Ellison, V. and B. Stillman (2003). "Biochemical characterization of DNA damage checkpoint complexes: clamp loader and clamp complexes with specificity for 5' recessed DNA." PLoS Biol 1(2): E33.
- Francia, S., R. S. Weiss, M. P. Hande, R. Freire and F. d'Adda di Fagagna (2006). "Telomere and telomerase modulation by the mammalian Rad9/Rad1/Hus1 DNA-damage-checkpoint complex." Curr Biol 16(15): 1551-1558.
- Furuya, K., I. Miyabe, Y. Tsutsui, F. Paderi, N. Kakusho, H. Masai, H. Niki and A. M. Carr (2010). "DDK phosphorylates checkpoint clamp component Rad9 and promotes its release from damaged chromatin." Mol Cell 40(4): 606-618.
- Gassen, A., D. Brechtefeld, N. Schandry, J. M. Arteaga-Salas, L. Israel, A. Imhof and C. J. Janzen (2012). "DOT1A-dependent H3K76 methylation is required for replication regulation in *Trypanosoma brucei*." Nucleic Acids Res 40(20): 10302-10311.
- Glover, L., S. Alsford, C. Beattie and D. Horn (2007). "Deletion of a trypanosome telomere leads to loss of silencing and progressive loss of terminal DNA in the absence of cell cycle arrest." Nucleic Acids Res 35(3): 872-880.
- Glover, L. and D. Horn (2012). "Trypanosomal histone gammaH2A and the DNA damage response." Mol Biochem Parasitol 183(1): 78-83.
- Godoy, P. D., L. A. Nogueira-Junior, L. S. Paes, A. Cornejo, R. M. Martins, A. M. Silber, S. Schenkman and M. C. Elias (2009). "Trypanosome prereplication machinery contains a single functional orc1/cdc6 protein, which is typical of archaea." Eukaryot Cell 8(10): 1592-1603.
- Grandin, N. and M. Charbonneau (2013). "RPA provides checkpoint-independent cell cycle arrest and prevents recombination at uncapped telomeres of *Saccharomyces cerevisiae*." DNA Repair (Amst).

- Grondin, K., G. Roy and M. Ouellette (1996). "Formation of extrachromosomal circular amplicons with direct or inverted duplications in drug-resistant *Leishmania tarentolae*." Mol Cell Biol 16(7): 3587-3595.
- Harper, J. W. and S. J. Elledge (2007). "The DNA damage response: ten years after." Mol Cell 28(5): 739-745.
- Harrison, J. C. and J. E. Haber (2006). "Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint." Annu Rev Genet 40: 209-235.
- Helt, C. E., W. Wang, P. C. Keng and R. A. Bambara (2005). "Evidence that DNA damage detection machinery participates in DNA repair." Cell Cycle 4(4): 529-532.
- Hitchcock, R. A., S. Thomas, D. A. Campbell and N. R. Sturm (2007). "The promoter and transcribed regions of the *Leishmania tarentolae* spliced leader RNA gene array are devoid of nucleosomes." BMC Microbiol 7: 44.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature 411(6835): 366-374.
- Huang, J., L. Zhang, W. Liu, Q. Liao, T. Shi, L. Xiao, F. Hu and X. Qiu (2012). "CCDC134 interacts with hADA2a and functions as a regulator of hADA2a in acetyltransferase activity, DNA damage-induced apoptosis and cell cycle arrest." Histochem Cell Biol 138(1): 41-55.
- Indiani, C. and M. O'Donnell (2006). "The replication clamp-loading machine at work in the three domains of life." Nat Rev Mol Cell Biol 7(10): 751-761.
- Jackson, S. P. and J. Bartek (2009). "The DNA-damage response in human biology and disease." Nature 461(7267): 1071-1078.
- Jiricny, J. (2006). "The multifaceted mismatch-repair system." Nat Rev Mol Cell Biol 7(5): 335-346.
- Kai, M. and T. S. Wang (2003). "Checkpoint activation regulates mutagenic translesion synthesis." Genes Dev 17(1): 64-76.
- Kanamitsu, K. and S. Ikeda (2011). "Fission yeast homologs of human XPC and CSB, rhp41 and rhp26, are involved in transcription-coupled repair of methyl methanesulfonate-induced DNA damage." Genes Genet Syst 86(2): 83-91.
- Kannouche, P. L., J. Wing and A. R. Lehmann (2004). "Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for

- the polymerase switch in response to DNA damage." Mol Cell 14(4): 491-500.
- Kaye, P. and P. Scott (2011). "Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface." Nat Rev Microbiol 9(8): 604-615.
- Kennedy, R. D. and A. D. D'Andrea (2005). "The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd." Genes Dev 19(24): 2925-2940.
- Khair, L., Y. T. Chang, L. Subramanian, P. Russell and T. M. Nakamura (2010). "Roles of the checkpoint sensor clamp Rad9-Rad1-Hus1 (911)-complex and the clamp loaders Rad17-RFC and Ctf18-RFC in *Schizosaccharomyces pombe* telomere maintenance." Cell Cycle 9(11): 2237-2248.
- Komatsu, K., K. M. Hopkins, H. B. Lieberman and H. Wang (2000). "Schizosaccharomyces pombe Rad9 contains a BH3-like region and interacts with the anti-apoptotic protein Bcl-2." FEBS Lett 481(2): 122-126.
- Komatsu, K., T. Miyashita, H. Hang, K. M. Hopkins, W. Zheng, S. Cuddeback, M. Yamada, H. B. Lieberman and H. G. Wang (2000). "Human homologue of *S. pombe* Rad9 interacts with BCL-2/BCL-xL and promotes apoptosis." Nat Cell Biol 2(1): 1-6.
- LeBowitz, J. H., H. Q. Smith, L. Rusche and S. M. Beverley (1993). "Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*." Genes Dev 7(6): 996-1007.
- Leprohon, P., D. Legare, F. Raymond, E. Madore, G. Hardiman, J. Corbeil and M. Ouellette (2009). "Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*." Nucleic Acids Res 37(5): 1387-1399.
- Lieber, M. R. (2008). "The mechanism of human nonhomologous DNA end joining." J Biol Chem 283(1): 1-5.
- Loeb, L. A. and R. J. Monnat, Jr. (2008). "DNA polymerases and human disease." Nat Rev Genet 9(8): 594-604.
- Malhotra, K., S. T. Kim and A. Sancar (1994). "Characterization of a medium wavelength type DNA photolyase: purification and properties of photolyase from *Bacillus firmus*." Biochemistry 33(29): 8712-8718.

- Martinez, P., J. M. Flores and M. A. Blasco (2012). "53BP1 deficiency combined with telomere dysfunction activates ATR-dependent DNA damage response." J Cell Biol 197(2): 283-300.
- McClintock, B. (1941). "The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays." Genetics 26(2): 234-282.
- Medhurst, A. L., D. O. Warmerdam, I. Akerman, E. H. Verwayen, R. Kanaar, V. A. Smits and N. D. Lakin (2008). "ATR and Rad17 collaborate in modulating Rad9 localisation at sites of DNA damage." J Cell Sci 121(Pt 23): 3933-3940.
- Melo, J. and D. Toczyski (2002). "A unified view of the DNA-damage checkpoint." Curr Opin Cell Biol 14(2): 237-245.
- Mendez, J. and B. Stillman (2000). "Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis." Mol Cell Biol 20(22): 8602-8612.
- Nardelli, S. C., J. P. da Cunha, M. C. Motta and S. Schenkman (2009). "Distinct acetylation of Trypanosoma cruzi histone H4 during cell cycle, parasite differentiation, and after DNA damage." Chromosoma 118(4): 487-499.
- Navadgi-Patil, V. M. and P. M. Burgers (2009). "The unstructured C-terminal tail of the 9-1-1 clamp subunit Ddc1 activates Mec1/ATR via two distinct mechanisms." Mol Cell 36(5): 743-753.
- Neto, J. L., C. B. Lira, M. A. Giardini, L. Khater, A. M. Perez, L. A. Peroni, J. R. dos Reis, L. H. Freitas-Junior, C. H. Ramos and M. I. Cano (2007). "Leishmania replication protein A-1 binds in vivo single-stranded telomeric DNA." Biochem Biophys Res Commun 358(2): 417-423.
- Nunes, V. S., J. D. Damasceno, R. Freire and L. R. Tosi (2011). "The Hus1 homologue of Leishmania major encodes a nuclear protein that participates in DNA damage response." Mol Biochem Parasitol 177(1): 65-69.
- Pandita, R. K., G. G. Sharma, A. Laszlo, K. M. Hopkins, S. Davey, M. Chakhparonian, A. Gupta, R. J. Wellinger, J. Zhang, S. N. Powell, J. L. Roti Roti, H. B. Lieberman and T. K. Pandita (2006). "Mammalian Rad9 plays a role in telomere stability, S- and G2-phase-specific cell survival, and homologous recombinational repair." Mol Cell Biol 26(5): 1850-1864.

- Passos-Silva, D. G., M. A. Rajao, P. H. Nascimento de Aguiar, J. P. Vieira-da-Rocha, C. R. Machado and C. Furtado (2010). "Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*." J Nucleic Acids 2010: 840768.
- Peacock, C. S., K. Seeger, D. Harris, L. Murphy, J. C. Ruiz, M. A. Quail, N. Peters, E. Adlem, A. Tivey, M. Aslett, A. Kerhornou, A. Ivens, A. Fraser, M. A. Rajandream, T. Carver, H. Norbertczak, T. Chillingworth, Z. Hance, K. Jagels, S. Moule, D. Ormond, S. Rutter, R. Squares, S. Whitehead, E. Rabbinowitsch, C. Arrowsmith, B. White, S. Thurston, F. Bringaud, S. L. Baldauf, A. Faulconbridge, D. Jeffares, D. P. Depledge, S. O. Oyola, J. D. Hilley, L. O. Brito, L. R. Tosi, B. Barrell, A. K. Cruz, J. C. Mottram, D. F. Smith and M. Berriman (2007). "Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease." Nat Genet 39(7): 839-847.
- Redon, S., P. Reichenbach and J. Lingner (2010). "The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase." Nucleic Acids Res 38(17): 5797-5806.
- San Filippo, J., P. Sung and H. Klein (2008). "Mechanism of eukaryotic homologous recombination." Annu Rev Biochem 77: 229-257.
- Sancar, A., L. A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz and S. Linn (2004). "Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints." Annu Rev Biochem 73: 39-85.
- Scher, R., J. B. Garcia, B. Pascoalino, S. Schenkman and A. K. Cruz (2012). "Characterization of anti-silencing factor 1 in *Leishmania major*." Mem Inst Oswaldo Cruz 107(3): 377-386.
- Sfeir, A. and T. de Lange (2012). "Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem." Science 336(6081): 593-597.
- Slamon, D. J., G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich and W. L. McGuire (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." Science 235(4785): 177-182.
- Squina, F. M., A. L. Pedrosa, V. S. Nunes, A. K. Cruz and L. R. Tosi (2007). "Shuttle mutagenesis and targeted disruption of a telomere-located essential gene of *Leishmania*." Parasitology 134(Pt 4): 511-522.

- Sterkers, Y., L. Lachaud, N. Bourgeois, L. Crobu, P. Bastien and M. Pages (2012). "Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*." Mol Microbiol 86(1): 15-23.
- Sterkers, Y., L. Lachaud, L. Crobu, P. Bastien and M. Pages (2011). "FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*." Cell Microbiol 13(2): 274-283.
- Tanaka, H. and M. C. Yao (2009). "Palindromic gene amplification--an evolutionarily conserved role for DNA inverted repeats in the genome." Nat Rev Cancer 9(3): 216-224.
- Thomas, S., A. Green, N. R. Sturm, D. A. Campbell and P. J. Myler (2009). "Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*." BMC Genomics 10: 152.
- Tiengwe, C., L. Marcello, H. Farr, C. Gadelha, R. Burchmore, J. D. Barry, S. D. Bell and R. McCulloch (2012). "Identification of ORC1/CDC6-interacting factors in *Trypanosoma brucei* reveals critical features of origin recognition complex architecture." PLoS One 7(3): e32674.
- Van der Ploeg, L. H., A. Y. Liu and P. Borst (1984). "Structure of the growing telomeres of *Trypanosomes*." Cell 36(2): 459-468.
- Wang, Q. E., C. Han, R. Zhao, G. Wani, Q. Zhu, L. Gong, A. Battu, I. Racoma, N. Sharma and A. A. Wani (2012). "p38 MAPK- and Akt-mediated p300 phosphorylation regulates its degradation to facilitate nucleotide excision repair." Nucleic Acids Res.
- Weiss, R. S., P. Leder and C. Vaziri (2003). "Critical role for mouse Hus1 in an S-phase DNA damage cell cycle checkpoint." Mol Cell Biol 23(3): 791-803.
- Wu, X., S. M. Shell and Y. Zou (2005). "Interaction and colocalization of Rad9/Rad1/Hus1 checkpoint complex with replication protein A in human cells." Oncogene 24(29): 4728-4735.
- Xu, M., L. Bai, Y. Gong, W. Xie, H. Hang and T. Jiang (2009). "Structure and functional implications of the human rad9-hus1-rad1 cell cycle checkpoint complex." J Biol Chem 284(31): 20457-20461.
- Xu, X., S. Vaithiyalingam, G. G. Glick, D. A. Mordes, W. J. Chazin and D. Cortez (2008). "The basic cleft of RPA70N binds multiple checkpoint proteins, including RAD9, to regulate ATR signaling." Mol Cell Biol 28(24): 7345-7353.

- Yoshida, K., H. G. Wang, Y. Miki and D. Kufe (2003). "Protein kinase Cdelta is responsible for constitutive and DNA damage-induced phosphorylation of Rad9." EMBO J 22(6): 1431-1441.
- Yousefzadeh, M. J. and R. D. Wood (2013). "DNA polymerase POLQ and cellular defense against DNA damage." DNA Repair (Amst) 12(1): 1-9.
- Zhao, Y., E. Abreu, J. Kim, G. Stadler, U. Eskiocak, M. P. Terns, R. M. Terns, J. W. Shay and W. E. Wright (2011). "Processive and distributive extension of human telomeres by telomerase under homeostatic and nonequilibrium conditions." Mol Cell 42(3): 297-307.
- Zou, L. and S. J. Elledge (2003). "Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes." Science 300(5625): 1542-1548.