Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

# **C**ARACTERIZAÇÃO DO GENE *LMHUS1* E DE SUA PARTICIPAÇÃO NO FENÔMENO DE AMPLIFICAÇÃO GÊNICA EM *LEISHMANIA SPP*.

Vinícius Santana Nunes

Ribeirão Preto 2011

Vinícius Santana Nunes

## **C**ARACTERIZAÇÃO DO GENE *LMHUS1* E DE SUA PARTICIPAÇÃO NO FENÔMENO DE AMPLIFICAÇÃO GÊNICA EM *LEISHMANIA SPP*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, para obtenção de título de Doutor.

Ribeirão Preto 2011

## Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

## **C**ARACTERIZAÇÃO DO GENE *LMHUS1* E DE SUA PARTICIPAÇÃO NO FENÔMENO DE AMPLIFICAÇÃO GÊNICA EM *LEISHMANIA SPP*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, para obtenção de título de Doutor.

Vinícius Santana Nunes

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi

Ribeirão Preto 2011

Nunes, Vinícius Santana

Caracterização do gene *LmHUS1* e de sua participação no fenômeno de amplificação gênica em Leishmania spp. / Vinícius Santana Nunes – Ribeirão Preto, 2011

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, para a obtenção de título de Doutor. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Orientador: Tosi, Luiz Ricardo Orsini.

Descritores: 1. *Leishmania major* 2. Manutenção do genoma 3. Reparo de DNA 4. Rad9/Rad1/Hus1 5. Amplificação gênica.

O essencial é invisível aos olhos.

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e com apoio financeiro da FAPESP.

AGRADECIMENTOS

### AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador **Prof. Dr. Luiz R. O. Tosi**, por confiar em mim a desenvolver um projeto no seu laboratório e me orientar de forma competente.

- Ao **povo brasileiro**, que muitas vezes com dificuldade pagam impostos que permite financiar projetos como esse aqui apresentado.

- Às **Profas. Dras. Nádia Monesi, Santuza M. R. Teixeira, Maria Carolina Q. B. Elias-Sabbaga e ao Prof. Dr. Paulo S. R. Coelho**, por aceitarem fazer parte da banca examinadora deste projeto, fico muito honrado.

- Aos meus colegas e grandes amigos do laboratório **Marlei** e **Nilmar** pela contribuição à realização deste trabalho e pela boa convivência, pois essa é a receita para manter uma boa equipe. Também pela a amizade e preocupação que eles têm em me ajudar fora do laboratório. Os dois são amigos que levo pra vida toda.

- À **Profa. Dra. Ângela Kaysel Cruz** pelas dicas e conselhos e por disponibilizar seu laboratório contribuindo para realização deste trabalho.

- Aos amigos do laboratório da Profa. Dra. Ângela Kaysel Cruz, Elton (Ceará), Juliano, Tiago, Elisa, Mônica, Pedro e Juliana pela amizade e apoio técnico.

- Ao **Prof. Dr. Carlos Renato Machado**, por me aceitar no seu laboratório um tempo para realizar experimentos e ao seu aluno **João Vieira Rocha** que me acompanhou nestes experimentos.

- Ao **Raimundo Freire** e ao **Jeziel Damasceno** por contribuir com resultados que somaram na publicação deste trabalho.

- Ao **Walter Turato** pelo apoio técnico nos experimentos analisados no citômetro de fluxo.

- Ao Lucas Anhezini pelo apoio no ensaio da marcação 3'-OH de DNA.

- A **Marcela Segatto** que é muito especial pra mim, pelo cuidado, pelo carinho, pelo exemplo que é, por dar sem receber, por transbordar alegria, por contagiar o amor nas pessoas, pelas lições de vida e por tudo que fez por mim até agora, sou muito grato.

- De novo e sempre à minha mãe, **Hebe**, que merece toda a gratidão do mundo, pois soube criar dois filhos como uma "leoa", enfrentando as peças que a vida pregou e vencendo. Criação formada por educação, carinho, amor, respeito, seriedade e incentivo. Fruto desse desempenho, hoje, eu, meu irmão e ela trilhamos uma vida invejável de muita paz e conquistas.

- De novo ao meu irmão, **Henrique**, que além de irmão sempre foi e é um grande amigo, aprendo muito com as atitudes dele e só a gente sabe da importância de um pro outro.

- Ao **Sérgio**, meu padrasto, por participar de perto dessa lida e por prontamente me ajudar em um momento difícil da minha vida.

- À Laura Baccili que por muito tempo se dedicou, esteve do meu lado nos momentos mais críticos, persistiu e se nossos esforços tomaram um rumo diferente daquele que sempre batalhamos com certeza o fizemos tentando acertar e o querendo o bem. Também porque viveu e aguentou (e aguenta) as dificuldades de criar um filho de um pós graduando tendo como meta educar bem nosso filhote, passando por cima de preconceitos. Do fundo do meu coração, torço por você e desejo o seu bem, sempre.

- Ao filhote que amo muito **Luiz Henrique**, que me dá forças quando diz "te amo papai". Precisaria escrever outras 100 páginas só pra tentar descrever o seu significado em minha vida (olhos cheios d'água).

- Ao meu pai, **Francisco**, que hoje está ausente, mas o tempo que esteve presente ensinou aos seus filhos muitas virtudes importantes na formação de um bom caráter.

 - Aos meus queridos, tios, tias (Edna, Pedro (Pedróca), Edson (Tatu), Ivonete, Moacir e Nair) e primos e primas (Eduardo (Duda), Juliano (Julieta), Thiago (Macaco), Patrícia (Paty), Katiúscia (Katchup), Pedro Antônio, Michel, Rose, Célio (Célim) e Eli), pela convivência e aprendizado, pois devo muito a esse pessoal, também aprendí muitas coisas boas que com certeza refletem hoje na pessoa que sou.

- À minha **Vó Lola**, que sempre me apoiou e deve estar "morrendo" de orgulho agora, de novo.

- Ao **Jefferson Gonçalves**, que acidentalemente foi esquecido dos agradecimentos na minha dissertação, mas que merecia ser muito agradecido. Faço isso aqui, pois sem sua ajuda não teria me formado em Biologia e muito menos feito mestrado além de ser um grande amigo. Obrigado.

- À **Ana Renófio e Pares Baccili**, por vibrarem, torcerem por mim e ajudar a mim e a meu filho sempre. E apesar de tudo são proativos em me ajudar nos momentos difíceis que tenho passado. Muito obrigado.

- Ao Ângelo, pela amizade que fizemos.

- Aos **professores das Faculdades Adamantinenses Integradas** (FAI) que são meus amigos, em especial os professores **Pedro Ruete** (Pedrão) e Waldemar (Wardema), que me ajudaram tanto na formação acadêmica.

- Aos amigos da minha **turma de Biologia da FAI** pelo companheirismo, amizade e respeito. Todos vocês fazem parte da minha formação e ficarão para sempre nas lembranças boas, e fica a esperança de um dia reencontrá-los.

- À **Neidóca** que me acolheu como filho, dando muito carinho e atenção durante a minha graduação. Muito obrigado pelos favores, pela preocupação e pelo carinho.

- Aos amigos do Laboratório de Análise Clínicas do Posto de Saúde de Adamantina, em especial ao Dr. Gilberto (Gil), onde estagiei por 2 anos e o que hoje eu sei de "bancada" devo grande parte a esse pessoal.

-Ao **Dr. Luiz** do Laboratório Dr. Mello, por me confiar um emprego quando eu mais precisei. Também aprendí muito neste emprego.

- Ao **Marcelo** e à **Patrícia**, pela atenção que tiveram comigo em um momento de dificuldade, servindo de ponte para o meu ingresso no grupo no qual hoje faço parte.

- Às amigas **Tânia** e **Viviane** pela amizade e por sempre atenderem os muitos pedidos de ajuda, na maior boa vontade.

- Aos amigos **Elton** (**Ceará**) e **Juliano** pelas risadas juntos, pela ajuda na bioinformática e pela parceria.

- À **Rosângela** (**Rô**) secretária da Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos (BCMBP) pelo carinho e auxílio.

- Às secretárias do departamento BCMBP, **Camila** e Lúcia pelo apoio burocrático.

- Aos **funcionários da limpeza e manutenção** do departamento (BCMBP), por nos proporcionar maior bem estar físico e pelos cuidados com o laboratório auxiliando de certa forma no andamento dos trabalhos.

- A todos os **professores**, alunos e funcionários do departamento BCMBP pela amizade que fizemos e pela interação do pessoal.

- Espero não ter esquecido de ninguém, se isso aconteceu me desculpe.

ÍNDICE

## ÍNDICE

## ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY	
1. INTRODUCÃO	
1.1 A doença e o parasito	01
1.2 O tratamento da doença	04
1.3 Plasticidade genômica em Leishmania major	05
1.4 Organização geral dos mecanismos de reparo de DNA	08
1.5 Papel do complexo 911 no reparo de DNA	12
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Cultivo de formas promastigotas de L. major	23
3.2 Contagem dos parasitos e curvas de crescimento	23
3.3 Transfecção em Leishmania	23
3.4 Preparação de células eletrocompetentes	24
3.5 Transformação em <i>E. coli</i> e seleção	24
3.6 Digestão com enzimas de restrição	25
3.7 Eletroforese em gel de agarose	25
3.8 Obtenção de sonda radioativa	26
3.9 Extração de RNA total	26
3.10 Northern blotting	26
3.11 Southern blotting	27
3.12 Síntese de cDNA	28
3.13 PCR em tempo real	28
3.14 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	29
3.15 Clonagem do fragmento gerado por PCR	29
3.16 Extração de DNA epissomal dos clones recombinantes	29
3.17 Sequenciamento de DNA	30
3.18 Fluorescencia	31
3.19 Quantificação de 3'-OH do DNA marcados com UTP-fluoresceina	31
3.20 Extração proteica por sonicação	31
3.21 Western blot	32
3.22 multido e purnicação da proteina recombinante EmjF07.0900	52
2.24 Experição Padiação gamma	33 วา
2.25 Tostos do rosistôncia a drogas	55 22
J.2J TESTES DE TESISTEITUIA A UTUEAS	55

## 4. RESULTADOS

4.1 Construção de vetores de expressão do LmHUS1 e obtenção de	linhagens
transfectadas	37
4.2 A Localização nuclear de LmHus1	39
4.3 A expressão do gene LmHUS1 e as resistências geradas	40
4.4 Quantificação de pontas de DNA nas linhagens tratadas com HU	43

4.5 LmHus1 e	resposta a danos no DNA	44
4.6 LmHus1 e sua expressão durante o ciclo de vida do parasito		
4.7 LmHus1 p	ossivelmente está envolvida em amplificação gênica	46
4.8 Expressão	heteróloga da LmjF07.0900 (Chk1- <i>like</i> ) e produção de anticorpo	48
4.9 Geração d	o transfectante LmCHK1	49
4.10 Ruptura	de um dos alelos do <i>LmHUS1</i>	51
5. DISCUSSÃO		59
6. APÊNDICES		
6.1 Apêndice		69
apêndice	la - Sequência do gene LmHUS1 (LmjF23.0290), 996pbs	69
apêndice	lb - Sequência traduzida do gene <i>LmHUS1 (LmjF23.0290),</i> 332 res	íduos
de aminoácido	OS	69
6.2 Apêndice	II - Vetores	70
apéndice	lla - vetor pXGHUS1	70
apêndice	llb - vetor pXGGFPHUS1	70
apéndice	lic - vetor pXGHUS1MYC	71
apendice	lld - vetor pGEM-1 easy	/1
6.3 Apendice	III - Alinhamento da sequencia da possível Chk1 de L.	major
(LmjF07.0900)	) e da proteina de levedura	72
6.4 Apendice	IV - Quadro de Iniciadores	/3
6.5 Apendice	V - Espaço para anotações da banca examidora	74
7. REFERENCI	AS BIBLIOGRAFICAS	81
LISTA DE FIGU	IRAS	
Figura i.	Representação das duas formas típicas de Leishmania	01
Figura ii.	Ciclo biológico de <i>Leishmania spp</i>	03
Figura iii.	Respostas a danos no DNA	11
Figura iv.	Esquema do recrutamento do 9-1-1 a sítios de danos no DNA	14
Figura 1.	Análise de restrição das clonagens de LmHUS1	38
Figura 2.	Localização nuclear da fusão GFPLmHus1	39
Figura 3.	Nothern	41
Figura 4.	Curvas de resistência do transfectante LmHus1	42
Figura 5.	LmHus1 medeia melhor recuperação do dano no DNA	42
Figura 6.	Quantificação do dano de DNA por citometria de fluxo	44
Figura 7.	LmHus1 e os testes a radiação-gamma e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	45
Figura 8.	As formas metacíclicas e procíclicas do GFP::LmHus1	46
Figura 9.	LmHus1 e amplificação gênica	47
Figura 10.	Expressão e purificação da proteína recombinate LmjF07.0900	49
Figura 11.	Análise de restrição da clonagem de <i>LmChk1</i> e a proteína endó	gena
Eigura 12	O Alala da gana I mHus1 interromaida	50
i igula 12. Eigura 12	Análisa da avarassão do LmHust na mutanto	55
Figura 17	Analise da expressao de Enfrust no mutante Curva de crescimento do mutanto EmBuci	54
Figura 15	Curvas de resistâncias do mutanto ImHus1 a drogas gonotóvicas	55
i igui a 13	Cuivas de resistencias do mutante cinflust a diogas genotoxicas	56
		50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Mecanismos de reparo de DNA e componentes	10
Tabela 2.	Proteínas conservadas nas respostas a danos no DNA	11

PUBLICAÇÃO

92

ABREVIATURAS

#### Abreviaturas

- DNA ácido desoxirribonucléico
- RNA ácido ribonucléico
- RNAm- ácido ribonucléico mensageiro
- tRNA RNA transportador
- PCR reação em cadeia da polimerase
- HU hidroxiuréia
- MMS metil metanosulfonato
- FLEO fleomicina
- OMS organização mundial da saúde
- CL leishmaniose cutânea
- MCL leishmaniose cutaneomucosa
- DCL leishmaniose cutânea difusa
- VL leishmaniose visceral
- BCG bacilo de Calmette-Guérin
- SbIII antimonial trivalente
- DHRF-TS diidrofolato redutase-timidilato sintase
- MRPA proteína de resistência multidrogas, P-glicoproteína A
- PTR1 pteridina redutase 1
- L. major leishmania major
- L. braziliensis leishmania braziliensis
- PIK fosfo-inositol quinase
- ATM proteína ataxia telangiectasia mutada
- ATR ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
- CHK quinase checkpoint
- BRCA breast cancer protein
- RPA proteina de replicação A
- RFC fator de replicação C
- ssDNA fita simples de DNA
- DSB quebra de dupla fita no DNA
- SFB soro fetal bovino
- LB Luria-Bertani

UV - ultravioleta

- SAT nourseotricina
- OLB mix oligo-labeling
- CT ciclos de amplificação
- DEPC dietil pirocarbonato
- PVP polivinil-pirrolidona
- BSA albumina de soro bovino
- GFP green fluorescence protein
- AMP ampicilina
- G418 geneticina
- DAPI marcador de DNA
- Gy grays
- IF imunofluorescência
- RT-PCR PCR em tempo real
- FACs citometria de fluxo
- TdT terminal deoxinucleotídeo transferase
- BER reparo de excisão de base
- WT linhagem selvagem
- PFGE eletroforese em campo pulsátil
- His histidina
- Ni níquel
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *peróxido de hidrogênio*
- NEO neomicina
- HYG higromicina
- DGCs clusters gênicos direcionais
- SSR regiões de mudança de fita
- UTR região não traduzida
- PCNA antígeno nuclear de proliferação celular
- Pol3 polimerase 3
- kDNA DNA mitocondrial
- PM membrana peritrófica

**RESUMO** 

#### Resumo

O parasita protozoário *Leishmania* apresenta um genoma plástico e dinâmico onde a amplificação gênica e translocações cromossomais são fenômenos comuns. Tal plasticidade sugere a necessidade de mecanismos robustos de reparo do DNA e de manutenção do genoma. A célula eucariótica desenvolveu sistemas de controle *checkpoint* que reconhecem estruturas alteradas de DNA e bloqueiam a progressão do ciclo celular permitindo que o reparo do DNA aconteça. Nestas células, o complexo heterotrimérico formado pelas proteínas Hus1, Rad9, e Rad1 participa nas etapas iniciais de reconhecimento e sinalização do estresse replicativo.

Neste trabalho mostramos que a proteína Hus1 homóloga de *Leishmania major* é uma proteína nuclear que melhora a capacidade do parasito em lidar com o estresse replicativo. A análise de *northern* e PCR em tempo real mostraram que, após a transfecção do gene, a linhagem selecionada apresenta níveis aumentados dos transcritos *LmHUS1*. A utilização de um anticorpo anti-LmHus1 demonstrou o aumento nos níveis da proteína nestas células. Ainda, a superexpressão de LmHus1 confere resistência às drogas genotóxicas hidroxiuréia (HU) e metil metanosulfonato (MMS), e a resistência à HU correlaciona-se com a redução de dano no DNA após a expressão da LmHus1. A ruptura de um dos alelos *LmHUS1* diminui os níveis do seu produto, compromete o crescimento do parasito e proporciona discreta diminuição na resistência às drogas genotóxicas. Resultados preliminares associam a expressão da LmHus1 ao fenômeno de amplificação gênica em *L. major*. Além disso, a possível quinase Chk1, efetora da sinalização iniciada em Hus1, foi clonada e transfectada no parasito, o anticorpo anti-Chk1 também foi produzido.

Finalmente, considerando que LmHus1 funcione na detecção do dano e controle de defeitos na replicação de DNA, formulamos a hipótese de que o produto deste gene atue na forquilha de replicação e participe no fenômeno de rearranjo do DNA e na formação de amplicons neste parasito.

#### Summary

The protozoan parasite Leishmania presents a dynamic and plastic genome in which gene amplification and chromosome translocations are common phenomena. Such plasticity hints at the necessity of dependable genome maintenance pathways. Eukaryotic cells have evolved checkpoint control systems that recognize altered DNA structures and halt cell cycle progression allowing DNA repair to take place. In these cells, the PCNA-related heterotrimeric complex formed by the proteins Hus1, Rad9, and Rad1 is known to participate in the early steps of replicative stress sensing and signaling.

Here we show that the Hus1 homolog of Leishmania major is a nuclear protein that improves the cell capability to cope with replicative stress. Northern analysis and real-time PCR showed that after transfection of the gene, the selected lineage presents increase in the *LmHUS1* transcripts levels and overexpression was confirmed using anti-LmHus1. Thus, overexpression of LmHus1 confers resistance to the genotoxic drugs hydroxyurea (HU) and methyl methanesulfonate (MMS) and resistance to HU correlates to reduced net DNA damage upon LmHus1 expression. Preliminary results associate the LmHus1 expression to the gene amplification phenomena in *L. major*. And a possible Chk1-like kinase was cloned and transfected into the parasite, the anti-Chk1 was also produced. Besides, LmHus1 mutant is presented, and the *LmHUS1* gene disruption decreases its product levels, leads to serious effects on growth, and presenting an slight decrease in the resistance to genotoxic drugs.

Finally, considering the hypothesis that LmHus1 participates in the damage sensing and in the control of the DNA replication threats, we hypothesized that the product of this gene acts in replication forks and is involved in DNA rearrangement s and in the amplicons generation in this parasite.

**INTRODUÇÃO** 

### 1. Introdução

#### 1.1 A doença e o parasito

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários parasitos do gênero *Leishmania*. Espécies deste gênero são flagelados pertencentes à ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae* (Roberts e Janovy, 2000). Estes parasitos possuem duas formas principais: uma flagelada ou promastigota. As formas promastigotas são alongadas podendo variar de 10 a 20µm e tem um flagelo livre que emerge do corpo do parasito na sua porção anterior. O gênero *Leishmania* possui uma única mitocôndria que contém seu próprio genoma (kDNA, ou cinetoplasto) composto de moléculas circulares de DNA, os maxi e mini-circulos, concatenados. O núcleo, de forma arredondada, situa-se na porção posterior do corpo do parasito permanece entre o núcleo e a bolsa flagelar, de onde emerge o flagelo (figura iA). As amastigotas, formas replicativas no hospedeiro vertebrado, podem ter diâmetros entre 2 e 4µm, núcleo grande e arredondado, o cinetoplasto adquire forma de um pequeno bastão e seu flagelo, não funcional, está internalizado no bolso flagelar (figura iB) (Rittig e Bogdan, 2000).



**Figura i.** Representação das duas formas típicas de Leishmania nos hospedeiros invertebrado e vertebrado. **(A)** Forma promastigota. **(B)** Forma amastigota. As estruturas flagelo, cinetoplasto, mitocôndria e núcleo estão indicadas na figura.

O ciclo de vida deste protozoário é estabelecido entre dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado, e o ciclo normalmente envolve mamíferos, considerados hospedeiros definitivos, e dípteros hematófagos da subfamília *Phlebotominae*, que são hospedeiros intermediários. Os flebotomíneos ingerem as formas amastigotas quando se alimentam do sangue de um mamífero infectado. No tubo digestivo do inseto, estas formas diferenciam-se e replicam-se como promastigotas (Dominguez e Torano, 1999) (figura ii).

A infecção do hospedeiro vertebrado tem início quando fêmeas de flebotomíneos infectados realizam o repasto sanguíneo e injetam formas promastigotas metacíclicas em sua pele. Nesta localização as formas inoculadas são fagocitadas principalmente por macrófagos. Entretanto, a entrada das formas promastigotas no macrófago não deflagra a explosão oxidativa, pois no interior do macrófago as formas metacíclicas se diferenciam em amastigotas, que são resistentes à ação de hidrolases presentes no fagolisossomo. Assim, as formas amastigotas se multiplicam por divisão binária até o rompimento da célula parasitada. Os parasitos liberados são fagocitados por macrófagos causando uma reação inflamatória local. A infecção do flebotomíneo se inicia com a picada em um mamífero infectado pela ingestão de macrófagos contendo amastigotas, e no trajeto pelo trato digestivo do inseto vetor as formas amastigotas são retidas na membrana peritrófica (PM, estrutura formada por quitina que reveste o intestino médio de diversos insetos) e se diferenciam em formas promastigotas procíclicos e, após o rompimento da PM, se associam à mucosa do trato digestivo (Sacks e Kamhawi, 2001). De forma geral, a maior parte das espécies de Leishmania completa o ciclo exclusivamente na intestino médio e anterior do inseto (subgênero Leishmania), porém os parasitos do subgênero Viannia sofrem uma etapa adicional de desenvolvimento na região posterior do intestino do flebotomíneo (Cupolillo, Medina-Acosta et al., 2000). Modificações das moléculas de lipofosfoglicanos (LPG), que revestem o parasito, ocorrem durante a metaciclogênese e são importantes para a perda de adesão do promastigota ao epitélio que possibilita a migração dos parasitos através do estômago para a faringe do inseto, onde ocorre a diferenciação para formas metacíclicas que migram para o aparelho bucal do inseto, para serem inoculadas no próximo hospedeiro vertebrado (Lainson e Shaw, 1988).

2



**Figura ii. Ciclo biológico de** *Leishmania spp.* As leishmanioses são transmitidas pela fêmea do mosquito flebotomíneo. Quando infectado, o flebótomo injeta as formas promastigotas do parasito durante o repasto sanguíneo. As formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos (1), e se transformam em amastigotas (2). As formas amastigotas se multiplicam nos macrófagos (3), posteriormente saindo e infectando novas células (4), podendo afetar diferentes tecidos no hospedeiro dependendo, em parte, da espécie de *Leishmania*. Isso dará origem às manifestações clínicas da leishmaniose. Mosquitos podem se infectar durante o repasto sanguíneo ingerindo macrófagos infectados pelas formas amastigotas (5). No trato digestivo do vetor, o parasito se diferencia para a forma promastigota (6), multiplicando-se e migrando à probóscide do inseto.

Pelo menos 20 espécies de *Leishmania* causam doenças no homem. A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera as leishmanioses como a segunda doença causada por protozoário de maior importância em saúde pública, que é normalmente classificada em quatro formas clínicas básicas: leishmaniose cutânea (CL), leishmaniose cutaneomucosa (MCL), leishmaniose cutânea difusa (DCL) e leishmaniose visceral (VL) (Roberts e Janovy, 2000). De acordo com dados da OMS, as leishmanioses colocam em risco cerca de 350 milhões de pessoas entre homens, mulheres e crianças em 88 países de todo o mundo, 13 dos quais estão entre as nações menos desenvolvidas do globo. A estimativa mundial é de 1 à 2 milhões de novos casos a cada ano, sendo 1-1,5 milhão de casos de leishmaniose cutânea e 500 mil casos de leishmaniose visceral. Cerca de 90% dos casos de leishmaniose visceral

ocorre em 5 países e 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorre em 7 países no mundo. Onde, o Brasil aparece na relação dos países nos dois casos (Who, 2002).

No Brasil, as leishmanioses estão registradas em 19 estados. A partir da década de 80, verificou-se um aumento no número de casos registrados de leishmaniose tegumentar, variando de 3.000 (1980) a 35.748 (1995). No período de 1985 a 2005, foram notificados uma média anual de 28.568 casos autóctones e coeficiente de detecção médio de 18,5 casos/1000.000 de habitantes (Ministério da Saúde, 2007). A forma visceral, que anteriormente apresentava um caráter eminentemente rural vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte. Segundo o Ministério da Saúde, em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos chegaram a 48.455, sendo que aproximadamente 66% deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Nos últimos 10 anos, a média anual de casos no País foi de 3.156 casos, e a incidência de dois casos/100.000 habitantes.

### 1.2 O tratamento da doença

Normalmente, uma infecção leishmaniótica primária, quando curada, leva à proteção do hospedeiro contra futuras infecções pela mesma espécie. Assim, o desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses também vem sendo estudado, porém sem grandes avanços. Segundo a OMS, há estudos sobre o desenvolvimento de dois tipos de vacinas: de primeira e segunda geração. A vacina de primeira geração consiste em utilizar o parasito morto juntamente a baixas concentrações de bacilo de Calmette-Guérin (BCG, vacina contra tuberculose). Vacinas de segunda geração consistem na geração de parasitos geneticamente alterados, vetores de expressão em humanos carregando genes do parasito, moléculas recombinantes, e também possível utilização ácidos nucléicos recombinantes а com (www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/pr13/leish.pdf). No entanto, o tratamento às leishmanioses nos indivíduos infectados ainda depende majoritariamente da utilização de quimioterápicos (Ouellette, Drummelsmith et al., 2004).

A principal ferramenta quimioterápica contra leishmanioses foi introduzida pelo médico brasileiro Gaspar Vianna em 1912, com a utilização do antimonial

4

tártaro emético (Neves, 2001). Ainda que antimoniais trivalentes (SbIII) tenham sido utilizados inicialmente, a forma pentavalente da droga mostrou-se mais eficiente, além de apresentar menor toxicidade. Assim, a principal forma de tratamento das leishmanioses atualmente é a administração parenteral de antimonial pentavalente (Glucantime<sup>®</sup>). Além de alta toxicidade em alguns casos, a terapia com antimoniais registra, por motivos diferentes, um grau considerável de insucesso no tratamento das leishmanioses mucocutânea e visceral (Berman, 2005).

Outras drogas, além dos antimoniais, podem ser empregadas no tratamento das diversas formas da leishmaniose. Entre estas drogas se destacam a pentamidina, a anfotericina B e a miltefosina. A pentamidina (Lomidina<sup>®</sup>) aparentemente interfere na síntese de DNA do protozoário e altera a morfologia do cinetoplasto. O exato mecanismo de ação da pentamidina ainda não é conhecido (Ouellette, Drummelsmith *et al.*, 2004). A anfotericina B é um potente antifúngico derivado de uma bactéria do gênero *Streptomyces*. Esta droga se liga aos esteróis da membrana celular, preferencialmente ao ergosterol, o principal esterol de membrana de fungos e tripanossomatídeos, provocando alterações estruturais (Singh, Tandon *et al.*, 2003). A miltefosina é um composto utilizado inicialmente no tratamento de neoplasias que pode ser administrado por via oral, o que minimiza as complicações associadas à administração parenteral. Esta droga mostrou-se bastante eficaz apesar de poder apresentar graves efeitos colaterais gastrointestinais (Kshirsagar, Ferner *et al.*, 2011; Sundar, Jha *et al.*, 2002).

Apesar da resposta imune do hospedeiro vertebrado ser determinante na cura desta doença (Berman e Webster, 1982; Carvalho, Johnson *et al.*, 1985), a falha terapêutica pode estar relacionada a fatores mediados pelo parasito, como por exemplo, o desenvolvimento de resistência a drogas (Grogl, Oduola *et al.*, 1989).

## 1.3 Plasticidade genômica em Leishmania major.

Rearranjos de DNA, como na formação de amplicons, na translocação de seqüências e nas alterações de ploidia são ferramentas valiosas na evolução de organismos que, como as leishmanias, não se reproduzem de forma sexuada. A plasticidade genômica determinada por estes fenômenos relaciona-se, portanto, à
variabilidade genética e à modulação e controle da expressão de genes. Ainda que a plasticidade genômica em *Leishmania* seja facilmente demonstrada, os mecanismos precisos que levam a essa maleabilidade são pouco conhecidos. Por exemplo, tentativas de inativação de genes essenciais de *L. major*, normalmente, levam à amplificação gênica e/ou a alterações de ploidia (Cruz, Titus *et al.*, 1993; Dumas, Ouellette *et al.*, 1997).

O genoma de *L. major* possui 32,8 megabases distribuídos em 36 cromossomos que variam de 0,28 a 2,8 megabases (Ivens, Peacock *et al.*, 2005) que não se condensam durante todo ciclo celular (Lighthall e Giannini, 1992). Este tripanossomatídeo é, via de regra, diplóide e apresenta um ciclo de vida assexuado (Iovannisci, Goebel *et al.*, 1984), porém recentemente (Akopyants, Kimblin *et al.*, 2009) foi demonstrada a ocorrência de ciclo sexual neste parasito, ocorrido nos estágios da infecção no inseto, e consistente com o processo meiótico descrito para tripanossoma (Jenni, Marti *et al.*, 1986; Gaunt, Yeo *et al.*, 2003).

A transcrição neste parasito é, via de regra, policistrônica e a formação dos RNA mensageiros maduros se dá por trans-splicing em um processo acoplado à poliadenilação (Borst, 1986; Lebowitz, Smith et al., 1993), que implica na ausência de íntrons. Porém, o cis-splicing foi demonstrado em tripanossomatídeos para o gene que codifica uma poli-A polimerase (Mair, Shi et al., 2000). Os demais genes que contêm íntrons codificam um tRNA-Tyr (Padilla-Mejia, Florencio-Martinez et al., 2009), uma RNA helicase, duas proteínas hipotéticas (Ivens, Peacock et al., 2005) e o RNA spliced leader (Van Der Ploeg, 1986). Os genes codificadores de proteínas encontram-se organizados em clusters gênicos direcionais (DGCs) no genoma de Leishmania (Ivens, Peacock et al., 2005), cada um destes associados a uma região de início de transcrição, que se situa nas regiões de mudança de fita (SSR) divergentes que não contêm seqüências promotoras canônicas para controlar a transcrição pela RNA polimerase II. Recentemente (Thomas, Green et al., 2009) foi demonstrado que histonas H3 acetiladas ocupam estas regiões de início de transcrição de RNA policistrônicos, o que sugere o envolvimento da remodelagem da cromatina no controle do início de transcrição. A anotação do genoma de L. major revelou a presença dos componentes básicos de da organização da cromatina e da maquinaria envolvida na sua remodelagem. Foram encontradas várias enzimas

6

modificadoras de histonas que podem influenciar na replicação, reparo de DNA, recombinação e transcrição. Duas famílias de acetiltransferases, pelo menos três famílias de metiltransferases e todas as classes conhecidas de histona deacetilases (Ivens, Peacock *et al.*, 2005). Baseado nestas informações, a estrutura da cromatina pode desempenhar um papel importante no controle da expressão de genes.

Portanto, o controle de expressão gênica nestes organismos é bastante peculiar. Assim, a regulação da expressão gênica em *Leishmania* deve depender de outros mecanismos como, por exemplo, a regulação pós-transcricional, envolvendo a maturação e estabilidade do RNA mensageiro (RNAm) e sua tradução. Outro processo capaz de participar da regulação de expressão gênica é a presença da maquinaria de RNAs de interferência descrito para *L. braziliensis* (Lye, Owens *et al.*, 2010). Além disso, mecanismos de amplificação gênica foram associados à modulação da expressão gênica em *L. infantum* (Leprohon, Legare *et al.*, 2009).

A amplificação gênica é um mecanismo de defesa em resposta a pressões do meio, como a ação de drogas. Neste fenômeno, genes ou regiões do genoma sofrem amplificação, gerando um aumento no número de cópias de porções específicas do DNA. Na maioria dos amplicons já descritos em *L. major* os locus amplificados estão flanqueados por repetições, invertidas ou diretas. Acredita-se que estas repetições tenham um papel importante na formação de amplicons (Beverley, 1991; Grondin, Roy *et al.*, 1996). Em *L. major*, os produtos de amplificação se apresentam como DNA extracromossomal circular ou linear (Beverley, 1991). Os genes aí codificados estão, normalmente, relacionados a mecanismos de resistência específicos.

Entre as amplificações gênicas conhecidas em *L. major*, podemos citar as regiões R e H. O locus R codifica, entre outros, a Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase (DHRF-TS), cuja amplificação confere resistência ao metotrexato (Beverley, Ellenberger *et al.*, 1986). O locus H é uma região de 45,4kb localizados no cromossomo 23 do parasito. Este locus codifica 12 genes, seis dos quais são, ainda, de função desconhecida. A maioria dos genes de função conhecida está envolvida em mecanismos de resistência a drogas.

Dentre os genes presentes na região H estão: o produto do PTR1 capaz de reduzir pteridinas e folatos e sua superexpressão torna a célula resistente à inibição

da DHFR-TS pelo metotrexato (Hardy, Matthews et al., 1997). Além disso, a expressão de PTR1 pode estar relacionada também à virulência em L. major. Linhagens do parasito onde o gene foi inativado apresentam níveis aumentados de metaciclogênese e uma maior virulência (Cunningham, Titus et al., 2001). O gene HTBF está relacionado à resistência a terbinafina. Os estudos em andamento sugerem que a resistência à terbinafina conferida por este gene pode envolver o aumento na formação e/ou redirecionamento de vesículas, otimizando processos de extrusão da droga e/ou reparo de membranas danificadas por este inibidor da Esqualeno epoxidase (Marchini, Cruz et al., 2003). A função da MRPA ainda não foi totalmente esclarecida. Esta proteína localiza-se em membranas intracelulares e atua sobre antimoniais conjugados a tióis. Possivelmente, a MRPA captura a droga em vesículas da via de exocitose conferindo assim a resistência (Do Monte-Neto, Coelho et al., 2011 ; Legare, Richard et al., 2001; Coelho, Beverley et al., 2003). Os genes do locus H são simultaneamente transcritos e, possivelmente, traduzidos. Assim, existe um interesse no estudo desta região do genoma e este considera a existência de sinergismo funcional entre os produtos gênicos aí codificados.

A caracterização dos genes de função desconhecida codificados no locus H de *L. major* identificou a ORF LmjF23.0290, anotada como proteína hipotética contendo um possível domínio Hus1. Como será apresentado aqui, esta proteína pode estar envolvida em processos determinantes da plasticidade genômica deste parasito.

# 1.4 Organização geral dos mecanismos de reparo de DNA

A estabilidade genômica é uma das principais condições à sobrevivência e ao funcionamento dos organismos. No entanto, várias situações podem provocar danos no DNA. Por exemplo, cerca de 10<sup>4</sup> eventos de dano no DNA podem ocorrer em uma célula de mamífero a cada dia (Lindahl e Nyberg, 1972). Erros no pareamento e replicação do DNA, excisão de nucleotídeos, além da quebra na dupla fita pela ação de radicais livres são alguns exemplos de situações endógenas que caracterizam o dano no DNA (Sancar, Lindsey-Boltz *et al.*, 2004). Além disso, danos

8

provocados por radiação ionizante (IR) e ação de componentes químicos são exemplos de situações genotóxicas exógenas (Featherstone e Jackson, 1999).

Além das mutações pontuais e pequenas deleções, descritas acima, a instabilidade genômica está também associada a mutações geradas a partir de grandes rearranjos cromossomais como translocações e amplificações de porções extensas de DNA. E normalmente, rearranjos e translocações ocorrem como conseqüência da ativação de proto-oncogenes na tumorigênese (Lengauer, Kinzler *et al.*, 1998), e as amplificações podem também ser geradas por indução de resistência a drogas (Cruz, Titus *et al.*, 1993; Dumas, Ouellette *et al.*, 1997; Ramachandran e Melnick, 1999).

Ainda, os danos que promovem a instabilidade genômica podem ser reparados de forma eficiente por mecanismos moleculares conservados (tabela 1). Alguns processos celulares, como o reparo de dano no DNA, podem ser compostos por vias e diferentes vias podem partilhar mecanismos moleculares semelhantes que ativam respostas celulares. No caso de reparo do DNA, estas respostas celulares são ativadas através de proteínas classificadas como sensoras, transdutoras e efetoras dos sinais destas vias (figura iii). Entretanto, a identidade das proteínas classificadas como transdutoras dos sinais é mais esclarecida do que a a identidade das proteínas classificadas como sensoras. Estes mecanismos conservados envolvidos na resposta a dano no DNA são compostos por quatro conjuntos de proteínas conservadas com motivos protéicos reconhecíveis (tabela 2). Um conjunto é composto de proteínas fosfo-inositol quinase (PIK), as quais incluem ATM e ATR em mamíferos e suas homólogas em levedura. Estas proteínas são centrais as vias de toda resposta a dano no DNA. Ainda, abaixo dessas vias, em outro dois conjuntos respectivamente, estão duas famílias de quinases checkpoint (CHK), a Chk1 e Chk2 e suas ortólogas, as quais em mamíferos são alvos de regulação por ATR e ATM (Zhou e Elledge, 2000). O quarto conjunto de proteínas envolvidas na resposta a dano no DNA, com motivos protéicos reconhecíveis, é formado pela família das proteínas que contêm as repetições BRCT, que incluem a proteína Rad9 e sua homóloga em levedura (Crb2), o papel preciso desta proteína e onde exatamente ela funciona com as respectivas PIKs, ainda não é bem entendido. Porém, Rad9 de Saccharomyces cerevisiae é requerida para fosforilação de Chk1 e Chk2 homólogas e interage fisicamente com ambas (Emili, 1998; Sun, Hsiao *et al.*, 1998; Vialard, Gilbert *et al.*, 1998; Sanchez, Bachant *et al.*, 1999). Porque se acredita que as PIKs fosforilam diretamente Chk1 e Chk2, e isto é possível porque Rad9 ajuda no recrutamento de substratos CHKs para PIKs na resposta a dano no DNA (Sun, Hsiao *et al.*, 1998).

Portanto, a ativação de complexos protéicos a partir de um dano no DNA leva a execução de funções da resposta a esse dano, as quais incluem substratos de ambas quinases PIK e CHK envolvidas no reparo do DNA, transcrição e regulação e controle do ciclo celular.

Mecanismos de reparo	Lesões que atua	Principais componentes protéicos	
Reparo de <i>mismacth</i> (MMR)	<i>Mismatches</i> no DNA decorrentes da replicação	MSH2- MSH6, MSH2-MH3	
Reparo de excisão de base (BER)	Bases anormais geradas por ação de Oxidantes	DNA glicosilases, APE1 endonuclease, DNA polimerases	
Reparo de excisão de Nucleotídeo (NER)	Lesões que interrompem a dupla-hélice do DNA como produto gerada pela Ação UV	RNA polimerase, XPC-HR23B, DDB1/2, XPA, XPE, XPF, XPG, RPA, PCNA	
Mecanismo de desvio de Translesão	Lesões que paralisam a forquilha na replicação do DNA	DNA polimerases, REV3, REV1	
Junção de fitas não Homólogas (NHEJ)	Quebra de dupla fita de DNA causada por radiação ou químicos	Ku, DNA-PKcs, XRCC4, XLF/ligase IV, MRE11-RAD50-NBS1	
Recombinação Homóloga (HR)	Quebra de dupla fita, paralisação da forquilha e DNA <i>crosslinks</i>	Rad51, Rad52, Rad54, BRCA2, RPA, FEN1, DNA polimerase e ATM	
Via mediada por ATM	Quebra de dupla fita (DSB)	ATM, MRN, Chk2 e BRCA1	
Via mediada por ATR	Simples fita DNA e resseção de DSB	ATR, ATRIP, RPA, Rad9-Rad1-Hus1, Rad17, Chk1, TopBP1, Claspin, BRCA1	

**Tabela 1.** Mecanismos de reparo de DNA e componentes em humano.



**Figura iii. Repostas a danos no DNA.** A presença de uma lesão no DNA, em que pode levar a quebras ou estresses na replicação, é reconhecida por várias proteínas sensoras, as quais desencadeiam sinais para repostas celulares, através de proteínas mediadoras e transdutoras destes sinais (Jackson e Bartek, 2009 modificado).

Classe funcional	Mamíferos	S. cerevisiae	S. pombe
Proteínas PCNA-like	Hus1	Mec3	Hus1
	Rad9	Ddc1	Rad9
	Rad1	Rad17	Rad1
Proteínas RFC- <i>like</i>	Rad17	Rad24	Rad17
	RFC2-5	RFC2-5	RFC3
Proteínas BRCT	BRCA1	Rad9 DPB11	Crb2/Rhp9 Cut5
Proteínas P13K-like	ATR	Mec1	Rad3
	ATM	Tel1	Tel1
Quinases efetoras	Chk1	Chk1	Chk1
	Chk2	Rad53	Cds1

Tabela 2. Proteínas conservadas nas respostas a danos no DNA

#### 1.5 Papel do complexo 9-1-1 no reparo de DNA.

A rápida detecção de lesões no DNA é essencial para a manutenção da integridade e sobrevivência de células. Por isso, os meios utilizados no reconhecimento de danos no DNA são eficientes e bem conservados. Como citado no item anterior, as vias de reparo de DNA, normalmente envolvem proteínas que se ligam preferencialmente a certas classes de lesões e estas diferentes vias trilham a sinais comuns. Além das cascatas de sinalização, as respostas aos danos incluem outros aspectos como mudanças na estrutura da cromatina no local do dano e modificações de proteínas envolvidas no processo de reparo. Todos estes eventos combinados aumentam a habilidade de células em reconhecer e sobreviver aos danos no DNA (Bohr, Okumoto *et al.*, 1986). Assim, uma simples quebra em um genoma de 15 milhões de pares de bases, com alto grau de empacotamento, como o de leveduras, pode ser facilmente detectada (Lee, Moore *et al.*, 1998).

Contudo, vias específicas têm evoluído para reconhecer, administrar e reparar danos à molécula de DNA e muitos tipos destes danos no DNA resultam na formação de regiões de simples fita (ssDNA). Estes incluem quebras de dupla fita (DSB) (Ohnishi, Mori *et al.*, 2009) e paralisação das forquilhas de replicação (Zegerman e Diffley, 2009). Estes vários tipos de regiões de ssDNA são reconhecidas pela proteína RPA, e o DNA revestido pela RPA serve como o substrato para o recrutamento de complexos de proteínas *checkpoints* (figura ivA) (Cai, Roginskaya *et al.*, 2007)(Zou, Liu *et al.*, 2003).

Um dos primeiros complexos recrutados para os sítios do ssDNA revestido de RPA é o complexo trimérico formado pelas proteínas Hus1, Rad9, and Rad1. A estrutura do complexo 9-1-1 relaciona-se a estrutura do complexo PCNA envolvido na replicação de DNA. O complexo PCNA através do fator de replicação C (Rfc) circula o DNA molde servindo de ponte para enzima Polimerase 3 (Pol3). A interação PCNA-Rfc/Pol3 previne a dissociação do DNA molde, estabilizando a elongação (Zou, Liu *et al.*, 2003)(Wu, Shell *et al.*, 2005)(Majka e Burgers, 2004). Assim, o complexo 9-1-1 é recrutado aos sítios de dano no DNA mediado pelo complexo Rad17-Rfc<sub>2-5</sub>, o qual é formado por quatro subunidades de fatores de replicação (Rfc2, Rfc3, Rfc4 e Rfc5) (Bermudez, Lindsey-Boltz *et al.*, 2003; Medhurst,

Warmerdam *et al.*, 2008; Sohn e Cho, 2009). Então, uma vez carregado na cromatina, o complexo 9-1-1 atua como sítio âncora para várias enzimas envolvidas na sinalização e no reparo de dano no DNA (figura ivB) (Parrilla-Castellar, Arlander *et al.*, 2004; Sohn e Cho, 2009). Por exemplo, o complexo 9-1-1 reforça a permanência do sensor ATR nos sítios de lesões via interação TopBP1. Onde, ATR está envolvido na iniciação do sinal através da fosforilação da quinase Chk1 efetora do sinal durante respostas a alguns tipos de danos no DNA (figura ivC) (Medhurst, Warmerdam *et al.*, 2008)(Weiss, Matsuoka *et al.*, 2002).

Estudos com leveduras e mamíferos têm demonstrado que Rad9, Rad1 e Hus1 são fatores essenciais para a atividade de reconhecimento e resposta a danos no DNA. Em levedura, deleções nos componentes do 9-1-1, em que interrompem a estrutura de cada uma destas proteínas, levam a falhas no controle do ciclo celular em resposta ao reparo e replicação do DNA (Enoch, Carr et al., 1992; Al-Khodairy, Fotou et al., 1994; Parrilla-Castellar, Arlander et al., 2004). Em mamíferos, a deleção de Rad9, Rad1 ou Hus1 resulta no reparo deficiente de dano no DNA e instabilidade genômica (Weiss, Enoch et al., 2000; Bao, Lu et al., 2004; Hopkins, Auerbach et al., 2004). Portanto, estes são exemplos da importância da estrutura do complex 9-1-1 para o controle do ciclo celular. Recentemente, a estrutura tridimensional do complexo 9-1-1 de humano e levedura foi elucidada através da cristalografia dos seus componentes (Sohn e Cho, 2009), e a elucidação da estrutura apresenta características importantes do funcionamento do complexo. Por exemplo, somente as proteínas Hus1 e Rad9 têm os requisitos conformacionais para acomodar as interações com as subunidades Rfc do complexo Rad17-Rfc2-5. Ainda, o modelo da estrutura observada esclarece como Rad17 seleciona 9-1-1 ao invés de PCNA nos sítios de reparo de DNA. Pois, Rad17 é o limitante na montagem do complexo Rfc-PCNA e 9-1-1, uma vez que Rad17 possui baixa identidade de seqüência com Rfc1 gerando uma competição na formação do complexo Rfc2-5 para montagem de 9-1-1/Rad17-Rfc<sub>2-5</sub> ou PCNA/ Rfc1-Rfc<sub>2-5</sub>. Em adição, o complexo 9-1-1, forma um complexo estável com extremidades 5' recessiva de DNA e aparentemente a cauda C-terminal de Rad9 regula a interação do 9-1-1 no DNA (Dore, Kilkenny et al., 2009).



**Figura iv. Esquema do recrutamento do complexo 9-1-1 a sítios de dano no DNA. (A)** Simples fita de DNA (ssDNA) gerada como um resultado de dano no DNA ou estresse replicativo é reconhecida pela proteína RPA. **(B)** O reconhecimento de ssDNA pela RPA leva ao recrutamento independente de ATR e Rad17 às lesões no DNA. Rad17 carrega o complexo 9-1-1 aos sítios de ssDNA e facilita a ativação de ATR através de uma interação com TopBP1. **(C)** Subsequentemente, ATR fosforila Claspin, a qual atua no recrutamento de Chk1 e promove sua fosforilação por ATR. ATR também fosforila Rad17. **(C)** A fosforilação de Rad17 via ATR estabiliza o complexo 9-1-1 aos sítios de dano no DNA (Medhurst, Warmerdam *et al.*, 2008, modificado)

Apesar de sua importância na manutenção do genoma de eucarioto superior, o complexo 9-1-1 não tem sido estudado em tripanossomatídeos. Não obstante, trabalhos têm sido feitos que elucidam importantes aspectos de reparo de DNA nestes protozoários (Passos-Silva, Rajao *et al.*,2010). Estes incluem o estudo do reparo de DSB e recombinação homóloga em tripanossomas (Barnes e Mcculloch, 2007; Glover e Horn, 2009) e reparo de *mismatches* in *Trypanosoma cruzi* (Augusto-Pinto, Teixeira *et al.*, 2003).

Porém, somente poucos estudos têm investigado a existência e funcionamento de reconhecimento, sinalização e maquinarias de reparo de DNA em *Leishmania spp.* Este inclui estudos sobre as proteínas AP endonuclease, Rad51, e BRCA2 (Mckean, Keen *et al.*, 2001; Misra, Hall *et al.*, 2005; Vidal, Harkiolaki *et al.*, 2007). Em adição, proteínas de *Leishmania* envolvidas em etapas iniciais da via de reparo de DNA não foram caracterizadas ainda. Portanto, investigamos se LmHus1 poderia apresentar algum papel no reparo de DNA no parasito protozoário *Leishmania*. Nosso estudo indentificou Hus1 homólogo de *Leishmania major* e exploramos seu envolvimento na resposta a estresses no DNA. Nós encontramos que LmHus1 desempenha um papel relevante na manutenção da integridade do DNA deste parasito.

**OBJETIVOS** 

# 2. Objetivos

Os objetivos formulados visaram caracterizar o gene *LmHUS1* de *L. major* e esclarecer o envolvimento da LmHus1 no reparo de DNA.

Mais especificamente, os objetivos foram:

1. A caracterização da localização da LmHUS1 na célula através da expressão de uma fusão entre *LmHUS1* e um gene repórter

 Estudar o efeito da superexpressão do LmHUS1 no perfil de resistência a drogas genotóxicas, na integridade do DNA cromossômico e na formação de amplicons.

3. Investigar o padrão alterado de fosforilação da possível proteína quinase Chk1 de *L. major* (LmjF07.0900).

4. O estudo do efeito da inativação do gene *LmHUS1* através da análise de alterações no perfil de resistência a drogas genótoxicas.

MATERIAL E MÉTODOS

#### 3. Material e métodos.

#### 3.1 Cultivo de formas promastigotas de L. major.

A manutenção das formas promastigotas de *L. major* LT252 selvagem, clone (MHOM/IR/84/LT252) (Kapler, Coburn *et al.*, 1990), bem como de linhagens mutantes do parasito, foi feita através de passagens em meio de cultivo M199 1X (Sigma-Aldrich), suplementado com HEPES 0,04M; adenina 0,1mM; biotina 50,0µg.mL<sup>-1</sup>; hemina 250,0µg.mL<sup>-1</sup>; soro fetal bovino (SFB) 10,0%. Em cultivos de transfectantes, o meio foi adicionado das drogas necessárias à seleção, nas concentrações adequadas.

#### 3.2 Contagem dos parasitos e curvas de crescimento.

A densidade de parasitos em suspensão foi determinada através de contagem em câmara de Neubauer. As curvas de crescimento das linhagens selvagens ou transfectantes foram determinadas a partir do inóculo de 2,0x10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup> em meio de cultivo M199 1X. As contagens foram realizadas até que as culturas do parasito atingissem a fase estacionária de crescimento.

#### 3.3 Transfecção em Leishmania.

Utilizamos a linhagem LT252 selvagem, de *L. major*, as culturas foram mantidas a 25-26°C, em M199 1X. A transfecção foi por eletroporação (Kapler, Coburn *et al.*, 1990; Laban, Tobin *et al.*, 1990; Coburn, Otteman *et al.*, 1991), células na fase logarítmica tardia foram lavadas em tampão para eletroporação - EPB (HEPES 21mM; NaCl 137mM, KCl 5mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,7mM e Glicose 6mM), e ressuspendidas em 400µL e mantidas no gelo. À suspensão de células, 5 a 50µg de DNA circular foram adicionados e a mistura transferida para uma cubeta de eletroporação. Utilizamos o aparelho *Gene Pulser* – BioRad e o módulo extensor de capacitância, nas condições: voltagem 450V, capacitância 500µF e cubeta de 2mm. Após o pulso as células foram mantidas em gelo por 10 minutos e transferidas para 10mL de meio M199 1X sem droga. As células foram recuperadas por incubação à 26°C, por 24 horas. Após esse tempo de recuperação as células foram plaqueadas

em meio M199 1X semi-sólido (ágar nobre 1%), acrescido com a droga ideal para seleção dos clones e mantida à 26°C.

# 3.4 Preparação de bactérias eletrocompetentes.

Para obtenção de bactérias eletrocompetentes, uma colônia da linhagem de *Escherichia coli* (EletroMAX<sup>TM</sup> DH10B<sup>TM</sup>) genótipo (F-*mcr*A  $\Delta$ (*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC)  $\varphi$ 80/*ac*Z $\Delta$ M15  $\Delta$ /*ac*X74 *rec*A1 *end*A1 *ara*D139  $\Delta$ (*ara, leu*)7697 *ga*/U *ga*/K  $\lambda$ -*rps*L *nup*G) foi inoculada em 2mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido (bacto triptona 10g.L<sup>-1</sup>; extrato de levedura 5g.L<sup>-1</sup>; NaCl 10g.L<sup>-1</sup>) e incubada sob agitação constante de 300rpm a 37°C por 16 horas. Este volume foi então transferido para 500mL de meio TY (bacto triptona 2%; extrato de levedura 0,5%) e, novamente, incubado a 37°C, sob agitação constante de 300rpm até que as células atingissem densidade óptica máxima de 0,4 em comprimento de onda 600nm. As células foram resfriadas em banho de gelo, distribuídas em frascos gelados e coletadas por centrifugação a 5000rpm por 5 minutos a 0°C. As células foram lavadas duas vezes em 50mL de água deionizada estéril e gelada, nas mesmas condições de centrifugação e depois lavadas duas vezes em 25mL de glicerol 10% (v/v em água), sendo ressuspendidas em um volume aproximado de 0,5mL do glicerol 10%, distribuído em alíquotas de 40µL e congeladas a –70°C.

#### 3.5 Transformação em E. coli e seleção

Para transformação de bactérias, 100ng de DNA foram adicionados a 40µL de células eletrocompetentes e submetidas a uma descarga elétrica de 2,5KV em um aparelho Gene Pulser – BioRad. As células foram recuperadas em 1mL de meio LB líquido e incubadas sob agitação constante de 300rpm a 37°C por 1 hora. A seleção de transformantes foi feita em placas com meio LB semi-sólido ágar 1,5% contendo as drogas necessárias à seleção do clone. A concentração de 100µg.mL<sup>-1</sup> para ampicilina que seleciona os vetores pGEM e pXG1 e 50µg.mL<sup>-1</sup> para nouseotricina (SAT) que seleciona o vetor pELSAT. As placas foram mantidas de 14-18 horas a 37°C.

# 3.6 Digestão com enzimas de restrição

Alíquotas contendo aproximadamente 500ng de DNA foram digeridas com endonucleases de restrição fornecido por New England Biolabs (USA) e Fermentas (USA) utilizando-se as condições especificadas pelos fabricantes

# 3.7 Eletroforese em gel de agarose

Análises de ácidos nucléicos digeridos ou produto de reação de PCR foram feitas por eletroforese em gel de agarose 0,8% ou 1%, respectivamente, preparado em tampão TAE 1X (Tris-Acetato 0,04M, EDTA 0,0001M). As eletroforeses foram realizadas neste mesmo tampão à temperatura ambiente. Os géis foram corados com brometo de etídio 0,5mg.L<sup>-1</sup> por 20 minutos e observados em trans-iluminador UV, modelo FBTIV-88 (FisherBiotech-USA).

Para separação dos cromossomos de L. major foram utilizados blocos de agarose que contêm o DNA genômico imobilizado. Os blocos foram obtidos a partir de culturas de L. major LT252 selvagem, transfectantes e mutantes crescidas em meio M199 1X completo, até atingir a fase logarítmica tardia de crescimento (1,0x10<sup>7</sup> células.mL<sup>-1</sup>). As células foram coletadas por centrifugação a 2000rpm por 10 minutos e ressuspendidas em meio M199 1X sem soro fetal bovino (SFB) de forma a obter uma suspensão com 3,5x10<sup>8</sup> células.mL<sup>-1</sup>. Então, uma solução de agarose LMP 2% (low melting point agarose) fundida foi diluída (v/v) a uma solução de PSG 2X (NaCl 130mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 142mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8mM; glicose 2%) para inclusão em molde de acrílico. Depois de retirados dos moldes, os blocos foram mantidos por dois dias em solução de lise (EDTA 0,5M, pH 9; SDS 1%; proteinase K 0,5mg.mL<sup>-1</sup>) a 42°C. Após a digestão com proteinase K, os blocos de agarose foram lavados com T.E. alto (Tris-HCl 200mM; EDTA 100mM) por dois dias, com trocas de solução a cada 24 horas e estocados nesta solução a 4ºC. O DNA cromossômico preparado em blocos de agarose foi separado por eletroforese em campo pulsado em gel de agarose 1,0% e solução tampão TBE 0,5X (Tris 0,045M; Ácido Bórico 0,045M; EDTA 0,001M). Utilizamos o aparelho CHEF MAPPER (BioRad) nas diferentes condições: (i) para separação dos cromossomos utilizamos pulsos 24m:03s e 3m:24s, gradiente 6.0 V/cm, ângulo de 120º, temperatura de 14ºC, corrida de 29 horas e (ii) para separação do DNA epissomal utilizamos 10 segundos constante, gradiente 4,5 V/cm, ângulo de 120º, temperatura de 14ºC, corrida de 18 horas.

#### 3.8 Obtenção de Sonda Radioativa

As seqüências de DNA utilizadas como sondas radioativas foram obtidas a partir de PCR ou disgestão. A marcação radioativa foi conduzida com método de *"Random Primer"*, com enzima Klenow (5'-3')Exo<sup>-</sup> (Biolabs) e  $\alpha$  <sup>32</sup>P-CTP (Feinberg e Vogelstein, 1983).

#### 3.9 Extração de RNA total.

A extração de amostras de RNA utilizava o reagente TRIzol (Gibco). De acordo com as instruções do fabricante, as células foram centrifugadas e lisadas pela adição do reagente. Essas amostras homogeneizadas foram incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente. Após uma lavagem com um volume de clorofórmio, o RNA foi recuperado na fase aquosa. Após precipitação com 0,5 volumes de isopropanol, e incubação de 10 minutos a temperatura ambiente as amostras foram submetidas à centrifugação a 12.000g por 10 minutos. As amostras foram então lavadas com etanol 70% e ressuspendidas em água livre de RNAse.

# 3.10 Northern blotting

Amostras de RNA foram separadas eletroforese por gel de agarose/formaldeído 1,5%. Após a separação, o gel foi lavado em água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) para a eliminação do formaldeído. O gel foi então submetido à transferência por capilaridade para uma membrana de nylon, através de solução SSPE 20X. A fixação do RNA à membrana foi feita por exposição à luz ultravioleta. A membrana foi incubada durante 4 horas, a 65°C em uma solução de pré-hibridação (SSPE 2X, SDS 0,5%, Ficoll 0,1%, polivinil-pirrolidona (PVP) 0,1%, albumina de soro bovino (BSA) 0,1% e 100µg.mL<sup>-1</sup> DNA de esperma de salmão).

A sonda específica para a seqüência do gene *LmHUS1* foi obtida por digestão de DNA plasmidial pGEMHUS1 com a enzima de restrição *EcoR*I gerando o

26

fragmento de interesse de 692pb, que foi purificado e utilizado no preparo da sonda radioativa. A marcação foi realizada nas seguintes condições: BSA 1X, tampão *mix oligo-labeling* 100:250:150 (OLB) (Feinberg e Vogelstein, 1983), 40µCi [alfa-<sup>32</sup>P] dCTP, 5 unidades da enzima de modificação *klenow fragment*, incubação a 37°C por 4 horas.

A hibridação da sonda radioativa foi realizada por incubação da membrana com a sonda diluída em 10mL de tampão de hibridação (SSPE 2X, SDS 0,5% p/v, Ficoll 0,02%, BSA 0,02% e 100µg.mL<sup>-1</sup> de esperma de salmão) por 20 horas a 65°C. Após a hibridação, foram realizadas as lavagens necessárias a eliminar as interações inespecíficas da sonda. Essas lavagens, feitas sob agitação por 15 minutos, foram: 2 lavagens com a solução SSPE 2X, SDS 1% a temperatura ambiente; 1 lavagem com a solução SSPE 1X, SDS 0,1% pré-aquecida a 65°C; 1 lavagem com a mesma solução a temperatura ambiente; e 1 lavagem com a solução SSPE 0,2X, SDS 0,1% a temperatura ambiente. Após as lavagens, a membrana foi seca e exposta por 48-72 horas a filme radiográfico a -70°C.

# 3.11 Southern blotting

Depois de ser separado por eletroforese, o DNA contido no gel foi tratado por 10 minutos em solução despurinizante (HCl 0,25M), duas vezes por 15 minutos em solução desnaturante (NaCl 1,5M e NaOH 0,5M), e mais duas vezes por 15 minutos em solução neutralizante (NaCl 1,5M e Tris-HCl 0,5M pH 7,0). Em seguida o gel foi enxaguado com a solução de SSPE 20X, NaCl 3,0M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2M, e EDTA 0,02M, pH 7,4, e o DNA foi transferido para suportes sólidos (membranas de nylon carregadas, GeneScreen - DuPont) por capilaridade, utilizando como fase móvel o tampão SSPE 10X. Por fim, a exposição à luz ultravioleta por 2 minutos fixou o DNA à membrana de nylon. As sondas específicas foram obtidas a partir de digestões de DNAs plasmidial, para o gene *LmHUS1* o plasmídeo pGEMHUS1 foi digerido com a enzima de restrição *EcoR*I gerando o fragmento de interesse de 692pb; para a marca SAT a combinação da enzimas *Xmn*I e *Ava*I digeriram o pELSAT gerando o fragmento de interesse de 441pb e por fim para a marca NEO o pXG1 foi digerido com a enzima *Spe*I que gerou o fragmento de interesse de 909pb. Estes fragmentos de interesse foram purificados e utilizados no preparo das sondas radioativas. As marcações foram realizadas nas seguintes condições: BSA 1X, tampão *mix oligo-labeling* 100:250:150 (OLB) (Feinberg e Vogelstein, 1983), 40μCi [alfa-<sup>32</sup>P] dCTP, 5 unidades da enzima de modificação *klenow fragment*, incubação a 37°C por 4 horas.

Em seguida, as membranas foram incubadas por 4 horas, a 65°C em 25mL de solução de pré-hibridação e a hibridação das sondas radioativas foram realizadas por incubação das membranas com as sondas diluídas em 10mL de tampão de hibridação por 20 horas a 65°C. Após a hibridização, foram realizadas as lavagens necessárias para eliminar as interações inespecíficas das sondas. Essas lavagens aconteceram sob agitação e por 15 minutos cada, sendo 4 lavagens com a solução SSPE 2X, SDS 0,5% sendo que 2 dessas lavagens foram realizadas a 65°C e 2 realizadas a temperatura ambiente, e por final 1 lavagem com a solução SSPE 0,1X a temperatura ambiente. Então, após as lavagens, as membranas foram secas e expostas por 12-24 horas a um filme de raio-X a -70°C.

# 3.12 Síntese cDNA

O RNA total das formas promastigotas de *L. major* foi isolado usando TRizol (Invitrogen). Para cada reação de Transcriptase Reversa foram usados 5µg de RNA total e a mesma foi realizada a 37°C por 50 minutos com a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) e inativada a 70°C por 15 minutos.

#### 3.13 PCR em tempo real

Para as reações de Real Time o produto final do cDNA foi diluído 10 vezes e 2µL do mesmo foi adicionado no volume reacional do PCR quantitativo, para determinar o padrão de expressão do gene *LmHUS1*, utilizando os iniciadores LT189 e LT190 (apêndice IV). Cada reação de PCR quantitativo possui 1x SYBR ® GreenER<sup>TM</sup> qPCR Supermix Universal (Invitrogen). Reações foram realizadas no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) usando o seguinte perfil reacional: denaturação inicial a 95°C por 5 min seguido por 30 ciclos com denaturação a 95°C por 30s, anelamento a 60°C por 15s, e extensão a 72°C por 15s. Todas as reações foram feitas em triplicata e os dados usados para as análises foram as médias aritméticas dos ciclos de amplificação (*CT*).

# 3.14 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction) (Saiki, Gelfand et al., 1988) foi feita pela adição de 100ng de DNA genômico, como molde, das linhagens LT252 selvagem e mutante, em um meio de reação contendo MgCl<sub>2</sub> 2mM, KCl 50mM, Tris-HCl 10mM pH 9, Triton X-100 0,01%, dNTPs 0,2mM, 100pmoles dos iniciadores LT105 e LT106 (apêndice IV) para amplificar LmHus1; dos iniciadores LT201 e LT202 (apêndice IV) para amplificar HYG (higromicina); dos iniciadores LT240 e LT241 (apêndice IV) para amplificar SAT; dos iniciadores LT111 (apêndice IV) que anela a 5' da marca SAT dentro da HUS1::NEOSAT (fragmento de nocaute de LmHUS1) e LT192 (apêndice IV), que anela à 3'do gene TTRS; dos iniciadores LT150 e LT106 (apêndice IV) que, respectivamente, anelam a 5' e 3' do gene LmHUS1. Após ser realizada a reação de amplificação nas condições: desnaturação 95ºC por 45 segundos, annealing 65ºC por 15 segundos, extensão 72°C por 1 minuto e 30 segundos para amplicar o gene LmHUS1; no caso das outras amplificações acima citadas a extensão foi de 4 minutos, 25 ciclos, as amostras foram estocadas a -20°C. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

#### 3.15 Clonagem do fragmento gerado por PCR

A reação de ligação foi realizada utilizando o kit *pGEM®-T easy Vector System 1* (Promega) seguindo as orientações do fabricante. A reação foi purificada através de uma extração com fenol, precipitada com etanol e ressuspensa em 10μL de água Milli-Q.

# 3.16 Extração de DNA epissomal dos clones recombinantes

Para extração de DNA plasmidial, os clones selecionados foram inoculados em 2mL de meio LB contendo a droga de seleção e incubados sob agitação constante de 300rpm a 37ºC por 18 horas. O volume total da cultura foi utilizado para a extração de DNA plasmidial (Miniprep) através do método de lise alcalina (Medina-Acosta e Cross, 1993). A partir de uma cultura de 2mL de bactérias crescida *overnight*, foi passado 1,5mL dessa cultura para um tubo de microcentrífuga e centrifugado a 13.200rpm por 30s para baixar as células. O *pellet* de bactérias foi ressuspendido em 100µL da soluçãol (glicose 60mM, Tris-Cl 25mM, EDTA 10mM). Depois de ressuspendidas, para lise celular foi adicionado 200µL da soluçãoll (NaOH 0,2N, SDS 1%). Em seguida, para neutralizar a reação foi adicionado 150µL da soluçãoIII (acetato de Potássio 5M, ácido acético 11,5%). A amostra foi centrifugada a 13.200rpm por 10 minutos, a temperatura ambiente, separando o *debris* celular e DNA genômico do DNA plasmidial. Ao sobrenadante, contendo o DNA plasmidial, foi submetido a extração de proteínas adicionando 400µL de fenol: clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após nova centrifugação nas mesmas condições, o DNA plasmidial, presente no sobrenadante foi precipitado com etanol 100% e lavado com etanol 70%. Ao final o DNA plasmidial foi ressuspendido na solução Tris-EDTA 10:1 contendo RNase 50µg.mL<sup>-1</sup> e estocado à -20°C.

Para obtenção de DNA epissômico em maior escala utiliza-se um protocolo também baseado na lise alcalina, porém sem a etapa de extração de proteínas por fenol, e utilizando colunas de troca iônica para purificação do DNA, seguindo orientações do kit de purificação fornecido por *QIAGEN Plasmid Handbook*.

# 3.17 Seqüenciamento de DNA

O DNA epissomal dos clones selecionados foram utilizados como molde para seqüenciamento que utilizou o seqüenciador automático *ABI prism 3100* e o *kit BigDye* (Perkin Elmer – Applied Biosystems). Os iniciadores M13 *forward* e M13 *reverse* (apêndice IV) foram utilizados por serem adequados a seqüenciamentos a partir do plasmídeo pGEM, para seqüenciamento a partir do plasmídeo pET28a foi utilizado o iniciador T7 *foward* (apêndice IV), e LT157 e LT158 (apêndice IV) para seqüenciamento a partir do plasmídeo pXG1. Através dos serviços remotos dos programas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) BLASTX e BLASTN, as seqüências foram comparadas aos bancos de dados que contêm seqüências de peptídeos ou DNA (<u>www.ncbi.nlm.nih.gov/</u>).

30

#### 3.18 Fluorescência

O total de  $1 \times 10^7 - 2 \times 10^7$  células de *L. major* foram lavadas em PBS1X duas vezes. A fixação foi conduzida durante 20 minutos com paraformaldeído na concentração de 4%. As células foram baixadas, ressuspendidas em 0,1% (m/v) Glicina/PBS e as aderidas em lamínulas previamente tratadas com Biobond. O período de adesão foi de 30 minutos em temperatura ambiente seguido de três lavagens com PBS1X. As lâminas foram preparadas com meio de montagem contendo DAPI (marcador de DNA) (ProLong Gold antifade reagent with DAPI-invitrogen). As análises feitas por Microscopia Confocal SP5.

# 3.19 Quantificação de 3'-OH do DNA marcados com UTP-fluoresceína

A linhagem LT252 selvagem e a transfectante LmHus1 foram cultivadas até a fase mid-log de crescimento (6-8.0x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>) e na densidade de células de aproximadamente 7,0x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup> foi adicionado ao meio de cultivo para concentração final de 10mM de hidróxiureia (HU). Após 48 horas da adição da droga, as células foram fixadas 20 minutos com paraformaldeído 4% e lavadas 3X com PBS1X, permeabilizadas 20 minutos com TRITON X-100 0,2% e lavadas 3X com PBS1X. Em seguida, pontas 3´-OH do DNA foram marcadas com UTP-fluoresceína em um ensaio utilizando a enzima Terminal Deoxinucleotídeo Terminal Transferase (TdT) (promega). Um total de 50.000 células de cada condição foram analizadas no aparelho FACSort BD (Becton Dickinson) usando o detector FLH-1 e o *software* Cell Quest Pro. Os histogramas foram analisados usando o aplicativo FlowJo versão 7.5.5 e *gate* usado foi baseado na fluorescência *background* das células da linhagem LT252 selvagem não tratadas .

# 3.20 Extração Protéica por Sonicação

Cultura de células na concentração de 10<sup>7</sup> células.mL<sup>-1</sup> foi centrifugada a 2000xg/4ºC durante 10 min. O precipitado de células foi lavado duas vezes em PBS1X e ressuspendido em 500 µl, para aplicação direta a SDS-PAGE, de Tris-HCl 10mM pH 7.0 suprido com inibidores de protease. As células foram lisadas por três

ciclos de sonicação, congelamento e descongelamento. O extrato foi centrifugado a 15000xg/4ºC por 30 minutos, o sobrenadante foi transferido para novos tubos, quantificado e submetido às análises.

#### 3.21 Western blot

Extratos protéicos foram submetidos à SDS-PAGE e após a separação, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando sistema de transferência semi-seco TE 70 PWR (Amersham, Bioscience). A transferência foi conduzida por 2 horas/10V em tampão de transferência (24mM Tris/192mM Glicina/20% [V/V] Metanol). A membrana foi bloqueada com PBS 1X/0,1% Tween 20 (PBS-T) contendo 5% (m/v) de leite em pó desnatado. O anticorpo primário foi incubado por duas horas a temperatura ambiente em PBS-T contendo 3% (m/v) de leite em pó desnatado. A diluição ótima do anticorpo primário foi de 1:1000 para o anti-LmjF07.0900 de coelho. Após incubação com anticorpo primário a membrana foi lavada 15 minutos e mais 3 X 5 minutos com PBS-T. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário (anti-Rabbit) conjugado com peroxidase, diluído em PBS-T na proporção de 1:1000. A incubação foi conduzida por 1 hora a temperatura ambiente ao final da qual a membrana foi submetida a lavagem por 15 minutos, seguida de mais três de 5 minutos com PBS-T. A membrana foi tratada com substrato para peroxidase e exposta a Amershan Hiperfilme ECL.

#### 3.22 Indução e purificação da proteína recombinante LmjF07.0900

Bactérias *E. coli* da linhagem BL21 contendo a construção pET28aLmjF07.0900 foram submetidas a indução com 0,1 mM de IPTG, na condição de 25°C; a 180rpm por 4h. Células foram centrifugadas a 7700g/10mim/4°C, lavadas 2 vezes e ressuspendidas em PBS1X contendo PMSF (1mM). Em seguida, as bactérias foram submetidas à lise por sonicação (Amplitude 45), com 6 aplicações de 10 segundos e intervalos de 10 segundos de descanso, sempre no gelo. Ao final deste tempo, o produto da lise foi centrifugado a 13000g/15min/4°C para separar as proteínas solúveis (sobrenadante) daquelas insolúveis (precipitado). A proteína LmjF07.0900 (LmChk1), fusionada a tag de Histidina, foi purificada da fração solúvel

do extrato de bactéria usando colunas de Ni-beads. A solução contendo 50mM de fosfato de sódio hidratado, 300mM de cloreto de sódio e 40mM de imidazol, foi utilizada como tampão de lavagem. E a eluição da proteína recombinante aconteceu no mesmo tampão com 250mM de imidazol.

#### 3.23 Análise em Citometria de fluxo (FACs) das formas isoladas GFP::LmHus1

As células de *L. major* promastigotas do transfectante GFP::LmHus1 foram cultivadas até fase mid-log (5-8x10<sup>6</sup>células) na presença de 8µg.mL<sup>-1</sup> de geneticina (droga de seleção), depois foi adicionado lectina de amendoim para concentração final de 100µg.mL<sup>-1</sup> e incubado sob agitação por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram separadas por centrifugação 100g, 5 minutos, temperatura ambiente. O aglutinado (procíclicas) e o sobrenadante (metacíclicas) foram levados ao citômetro de fluxo para quantificação da fluorescência.

# 3.24 Exposição à Radiação gamma

Culturas dos parasitos, em triplicata, na densidade de 3x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup> foram irradiados na dose de 500Gy (grays) na taxa de 25Gy por minuto. Em seguida as tampas das garrafas das culturas foram abertas para liberar o ozônio produzido. Em seguida as culturas foram acompanhadas até a fase log-tardia de cada linhagem.

# 3.25 Testes de resistência a drogas

Os testes de resistência, das linhagens tranfectante e mutante LmHus1, foram realizados em triplicata em concentrações variáveis das drogas hidróxiureia (HU) (2,5; 5; 10; 15; 20;  $30\mu g.mL^{-1}$ ), metil metanosulfonato (MMS) (45, 70, 90, 180, 363, 725 $\mu$ M), fleomicina (FLEO)(0,5; 1,5; 3; 4; 6  $\mu g.mL^{-1}$ ), etoposida (1, 10, 50, 100  $\mu g.mL^{-1}$ ) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (100, 150, 200, 300, 400 $\mu$ M). Como controles foram utilizadas a linhagem LT252 selvagem, a linhagem originada do transfectante LmHus1 que perdeu o plasmídeo (a passagem por 100 gerações em meio sem a droga de seleção promove a perda do plasmídeo - neste caso o pXGHUS1) e a linhagem transfectante pXG1 sem inserto.

# **RESULTADOS**

#### 4. Resultados

# 4.1 Construção de vetores de expressão do *LmHUS1* e obtenção de linhagens transfectadas.

A análise *in silico* dos genes contidos no locus H do cromossomo 23 de *L. major* revelou que o gene *LmjF23.0290* (*LmHUS1*) possui um possível domínio Hus1 (Nunes, Damasceno *et al.*, 2011). A proteína Hus1 vem sendo caracterizada em outros organismos e está envolvida no reparo do DNA e controle do ciclo celular (Canman, 2001; Parrilla-Castellar, Arlander *et al.*, 2004; Niida e Nakanishi, 2006). Assim, diante dessas informações nossa hipótese de que o gene *LmHUS1* pode ser a proteína Hus1 de *L. major*. Portanto os experimentos que foram realizados estão voltados para a investigação da possível participação deste gene no reparo de DNA e na formação de amplicons da região H no parasito.

Tanto para isolar o gene do genoma quanto para gerar fusão do produto do gene com epítopo cMyc-taq, foram desenhados iniciadores específicos para a reação em cadeia da polimerase (PCR). Para isolar o gene e gerar o clone pXGHUS1 (apêndice IIa) utilizamos os iniciadores LT105 e LT106 (apêndice IV). Foram adicionados sítios para as enzimas de restrição BsrGI e BgLII. Nos iniciadores LT105 e LT106 respectivamente para facilitar e direcionar a clonagem do produto do PCR do gene em fusão amino-terminal (N-terminal) com GFP no vetor pXGGFP (figura 1A, apêndice IIb). Também, para geração do fragmento de fusão carboxi-terminal (C-terminal) com cMyc, utilizamos os iniciadores LT150 e LT151 (apêndice IV). O iniciador LT151 contém a seqüência cMyc em fusão à seqüência do gene. Os iniciadores LT150 e LT151 contêm sítio para enzima *BgL*II para facilitar clonagem no vetor pXG1 e gerar o pXG1HUS1MYC (apêndice IIc). Os fragmentos amplificados a partir destes pares de iniciadores, contendo a seqüência do LmHUS1 e também da fusão cMyc foram clonados no vetor pGEM t-easy (apêndice IId), e em seguida subclonados no vetor de expressão pXG1. As análises de restrição que confirmam as clonagens estão apresentadas na figura 1. As clonagens também foram confirmadas por següenciamento do inserto destes clones.



**Figura 1. Análise de restrição das clonagens de** *LmHUS1***.** Figura dos géis apresentando os padrões de bandas gerados pela digestão dos clones com a enzima *Pvull.* **(A)** O padrão do produto da digestão, 4085; 2566; 912 e 725 pares de base, confirma a clonagem do DNA pXGGFPHUS1 (I). **(B)** A confirmação se estende aos clones pXGHUS1 (II) e pXGHUS1MYC (III), respectivamente, com os padrões de 4389; 1846; 912; 725pb e 4355; 1844; 912 e 725pb. O marcador de peso molecular DNA Lambda digerido com *Hind*III está representado de 0,5 a 23,1kb e os DNAs corados com brometo.

Visando a caracterização funcional do gene *LmHUS1*, transfectamos os DNAs dos clones pXGHUS1, pXGHUS1MYC e pXGGFPHUS1 em *L. major*. As linhagens geradas LT[*pXG1<sup>8</sup>HUS1*], LT[*pXG1<sup>8</sup>HUS1MYC*] e LT[*pXGGFP<sup>8</sup>HUS1*] que, respectivamente, serão chamadas nesta tese de transfectantes LmHus1, LmHus1Myc e LmGFPHus1, foram selecionadas em meio M199 1X semi-sólido na presença de 16µg.mL<sup>-1</sup> de geneticina (G418). Após a seleção, as linhagens transfectadas foram passadas para meio M199 1X líquido e cultivadas na presença de 8µg.mL<sup>-1</sup> de G418.

Para confirmar se os transfectantes selecionados realmente carregavam os plasmídeos eletroporados pXGHUS1, pXGHUS1MYC e pXGGFPHUS1, foi feito a extração de DNA plasmidial destes transfectantes seguido de transformação em bactéria *E. coli*. As bactérias transformadas foram selecionadas em placas de cultura contendo 100µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina (AMP). O DNA plasmidial destes clones foi seqüenciado e digerido com a enzima de restrição *Pvu*II. Tanto o seqüenciamento quanto a digestão confirmaram a identidade correta dos clones que apresentaram o mesmo padrão de restrição observado na figura 1.

# 4.2 A localização nuclear de LmHus1

Como apresentado acima, o gene *LmHUS1* foi clonado em fusão GFP Nterminal. Depois de selecionada em meio semi-sólido, a linhagem transfectada com a construção GFPLmHus1 foi cultivada na concentração de 8 µg.mL<sup>-1</sup> de G418.

O transfectante GFPLmHus1 foi submetido à análise de fluorescência utilizando microscopia confocal SP5. Cerca de 1,0x10<sup>6</sup> células foram preparadas para microscopia partindo da cultura do transfectante GFPLmHus1 na densidade de aproximadamente 1,0x10<sup>7</sup> células.mL<sup>-1</sup>. As imagens obtidas mostram localização nuclear da LmHus1, pois a marcação para a fusão GFPLmHus1 co-localiza com a marcação de DAPI correspondente ao núcleo (figura 2). Outro transfectante, o LmHus1Myc, também foi submetido a análises de imunofluorescência, e estas mostraram que o anti-myc não detectou o produto da fusão LmHus1Myc, por este motivo o transfectante LmHus1Myc não foi utilizado nos nossos estudos.



**Figura 2. Localização nuclear da fusão GFPLmHus1.** A análise de fluorescência indica que a fusão GFPLmHus1 (verde) co-localiza com a marcação do DNA nuclear (n). As imagens foram visualizadas utilizando microscópio confocal Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) usando objetiva de imersão 100X. As imagens foram processadas usando o software Leica v2.1104; o núcleo (n) e o kinetoplasto (k) estão indicados; as barras representam escala de 5µm.

#### 4.3 A expressão do gene LmHUS1 e as resistências geradas

Visando a caracterização do *LmHUS1*, foram geradas linhagens onde a expressão do gene está aumentada. Experimentos de *northern blot* confirmaram os níveis e o tamanho dos transcritos conforme mostrado na figura 3A. O nível basal do transcrito do *LmHUS1* não foi detectado, como podemos observar na raia 1 e 2 da figura 3A, que mostram a linhagem LT252 selvagem e transfectante pXG1 (linhagem que carrega o plasmídeo pXG1 vazio), respectivamente. Por outro lado, transcritos do gene são observados nas linhagens transfectantes LmHus1, com tamanho de aproximadamente 1kb (raia 3 figura 3A), GFPLmHus1 com tamanho de cerca de 1,7kb (raia 4 da figura 3A) e na LmHus1Myc, aproximadamente 1kb (raia 5 figura 3A). Ainda na figura 3, é importante ressaltar que marcações inespecíficas aparecem no tamanho de aproximadamente 2kb e que a expressão do *LmHUS1* na linhagem LmHus1Myc é maior pelo fato de que a linhagem está sob pressão de 200µg.mL<sup>-1</sup> de geneticina (G418), droga utilizada na seleção das linhagens, enquanto que as linhagens GFPLmHus1 e transfectante LmHus1 estão sob pressão de 8µg.mL<sup>-1</sup> de G418.

Ainda, para analisar o nível de transcritos do gene ao transfectante LmHus1 utilizamos a análise de PCR em Tempo Real. Para tanto, o transfectante LmHus1 foi cultivado em meio M199 1X, na presença de 8µg.mL<sup>-1</sup> de G418, até a fase logarítimica de crescimento (6.0x10<sup>6</sup> –1.0x10<sup>7</sup> células.mL<sup>-1</sup>). Em seguida, o RNA total da cultura foi extraído por TRIZOL, quantificado e tratado com DNase. Novos iniciadores para a amplificação do *LmHUS1* foram desenhados, LT189 e LT190 (apêndice IV), e antes das reações de RT-PCR foi realizado um PCR convencional usando como molde o DNA genômico da linhagem selvagem, para confirmar a especificidade dos iniciadores (dados não demonstrados). A análise de PCR em tempo real (RT-PCR) mostrou que há um aumento de 9 vezes nos níveis de transcritos deste gene no transfectante LmHus1 quando comparado à linhagem LT252 selvagem (figura 4B).

40



**Figura 3. (A)** *Northern blot.* Análise de *northern blot* das linhagens LT252 selvagem de *L. major* (1) e dos transfectantes: pXG1 (2), LmHus1 (3), GFPLmHus1 (4) e LmHus1Myc (5). A hibridação com sonda específica *LmHUS1* (seqüência complementar aos transcritos do gene *LmHUS1* sintetizada e marcada com radioativo) mostrou um aumento no nível de transcrito do gene nos transfectantes. Gel corado com brometo de etídeo foi utilizado como controle. O marcador de peso molecular RNA ladder está representado na figura no tamanho 0,5 *Kb*, *1Kb* e *3Kb*. (B) Expressão do gene *LmHUS1* na linhagem transfectante. A análise de expressão, por PCR em tempo real (RT-PCR), no transfectante LmHus1 em relação à linhagem selvagem confirmou o aumento da expressão do gene em 9X. O experimento foi normalizado com o gene constitutivo glicose-6P-desidrogenase (G6PD).

Para iniciar a investigação funcional deste gene, o transfectante LmHus1 foi testado quanto à resistência às drogas hidroxiuréia (HU) que inibe a síntese de nucleotídeos e interrompe os eventos de transcrição e replicação na célula, metil metanosulfonato (MMS) que metila o DNA na N<sup>7</sup>-deoxiguanina e N<sup>3</sup>-deoxiadenina desestruturando-o e gerando quebras e fleomicina (FLEO), classificada como radiomimética e é um glicopeptídeo que interage com DNA causando sua desestruturação (figura 4). Os testes de resistência foram realizados em triplicata em concentrações variáveis da droga, utilizando como controles a linhagem LT252 selvagem, a linhagem originada do transfectante LmHus1 que perdeu o plasmídeo (a passagem por 100 gerações em meio sem a droga de seleção promove a perda do plasmídeo - neste caso o pXGHUS1) e a linhagem transfectante pXG1 sem inserto. Como apresentado na figura 4A e 4B, o transfectante LmHus1 mostrou-se resistente a essas drogas. Por outro lado, o transfectante LmHus1 apresentou sensibilidade a droga fleomicina comparada àquelas observadas nos controles (figura 4C).


**Figura 4. Curvas de resistência do transfectante LmHus1** ( $\bigcirc$ ) às drogas (**A**) hidróxiuréia, (**B**) metil metanosulfonato (MMS), (**C**) fleomicina em relação à linhagem selvagem LT252 ( $\bullet$ ), linhagem originada do transfectante LmHus1 que perdeu o plasmídeo ( $\Box$ ) e o transfectante PXG1 ( $\Delta$ ).

Considerando o envolvimento de LmHus1 na manutenção da integridade de DNA, realizamos um ensaio de recuperação de células expostas ao dano do DNA. Culturas das linhagens LT252 selvagem, transfectante LmHus1 e transfectante pXG1 foram cultivadas até a fase mid-log de crescimento (6-8,0x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>) e adicionadas de HU para concentração final de 10mM. Após 48 horas, as células tratadas eram inoculadas em densidade de 2,0x10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup> em meio fresco. O crescimento era acompanhado por vários dias até a fase log-tardia de cada linhagem. Na figura 5, observamos que o transfectante LmHus1 apresenta uma capacidade maior de recuperação do tratamento por HU quando comparado aos controles.



**Figura 5. Expressão de LmHus1 medeia melhor recuperação do dano no DNA.** Ensaio de recuperação do transfectante LmHus1 (•) ao tratamento de 48 horas com hidroxiuréia (10mM) em relação às linhagens LT252 selvagem ( $\odot$ ) e transfectante pXG1 ( $\Delta$ ). As células foram contadas diariamente por 11 dias. A densidade de células está representada pela escala logarítmica.

### 4.4 Quantificação de pontas de DNA nas linhagens tratadas com Hidroxiuréia

Resistência a drogas em Leishmania pode ser mediada por diversos mecanismos. Assim, a resistência às drogas testadas nos experimentos apresentados acima poderia não ser determinada pela expressão aumentada da proteína LmHus1. Portanto, considerando a hipótese de resistência mediada pela LmHus1, supomos que essa resistência poderia estar relacionada com uma possível vantagem no mecanismo de reparo do DNA. Baseado nesta hipótese, a integridade do DNA das linhagens selvagem e mutante, tratados com HU, foi investigada. Então após tratamento das culturas, pontas 3'-OH do DNA foram marcadas com UTPfluoresceína e a marcação pôde ser quantificada por citometria de fluxo (FACs). Este experimento possibilitou quantificar pontas no DNA causadas pela parada da replicação em resposta ao tratamento por HU, nas linhagens analisadas. Nos histogramas da análise por FACs, apresentados na figura 6, podemos verificar que após 48 horas do tratamento os perfis de marcação das linhagens LT252 selvagem e transfectante LmHus1 são diferentes. Na figura 7, o experimento revelou que 40,8% das células do transfectante LmHus1 expostas à HU (LmHus1 + HU; painel esquerdo acima) foram comparáveis as células controle da linhagem LT252 selvagem (WT) que não foram expostas à HU (WT; painel esquerdo abaixo). Por outro lado, até 90% das células da linhagem selvagem expostas à HU (WT + HU; painel direito acima) apresentaram níveis de pontas 3'-OH do DNA comparáveis às células que foram tratadas com DNase (WT + DNase; painel esquerdo abaixo).



**Figura 6. Quantificação do dano de DNA por citometria de fluxo.** O dano no DNA foi investigado em células LT252 selvagem (WT) e transfectante LmHus1 tratadas, e não tratadas, por HU (10mM) usando marcação *in situ* de pontas 3'-OH do DNA utilizando a enzima *Terminal deoxynucleotidyl Transferase* (TdT); O total de 50.000 células de cada condição foram analisadas no FACSort BD (Bencton Dickinson) usando detector FLH-1 e o *software* Cell Quest Pro. Histogramas foram analisados usando FlowJo versão 7.5.5; o *gate* usado foi baseado no *background* da fluorescência de células selvagem não tratadas. Painéis esquerdo e direito acima são das células das linhagens transfectante LmHus1 e selvagem (WT) tratadas com HU, respectivamente. Painel esquerdo abaixo mostra células da linhagem selvagem (WT) submetida, antes da marcação, ao tratamento com DNase.

#### 4.5 LmHus1 e resposta a danos no DNA

Visando entender o envolvimento de LmHus1 no reparo de DNA, estabelecemos colaboração com o Prof. Carlos Renato Machado da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Nesta colaboração, o transfectante LmHus1 foi exposto à radiação gamma que gera quebras de dupla fitas do DNA (An, Huang *et al.*, 2010). Culturas das linhagens LT252 selvagem, transfectante LmHus1 e transfectante pXG1 (vetor vazio) foram cultivadas até a fase inicial da log de crescimento (3,0x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>) e irradiadas na dose de 500*Grays* (Gy), numa taxa de 25Gy por minuto. O crescimento foi acompanhado diariamente até a fase log-tardia de cada linhagem. Na figura 7A, observamos que o transfectante LmHus1 não contribui para resistência à exposição aos raios gamma. Além disso, amostras diárias das culturas das linhagens foram utilizadas para análise do cariótipo por

PFGE, e a integridade do DNA cromossomal do transfectante LmHus1 foi comparável aos controles (figura 7B).

Ainda, testamos o transfectante LmHus1 no tratamento com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), um oxidante que oxida bases do DNA e ativa a via de excisão de bases (BER). Este tipo de dano é reconhecido por MutS, MutH e MutL e o reparo envolve polimerase-beta e glicosilases como OGG1 e Fpg (Robertson, Klungland *et al.*, 2009; Bai, Madabushi *et al.*, 2010). Para tanto, os testes de resistência ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi repetido em triplicata biológica em concentrações variáveis deste oxidante. A linhagem LT252 selvagem e o transfectante pXG1 foram utilizados como controle. Como apresentado na figura 7C, o transfectante LmHus1 mostrou-se resistente.



**Figura 7.** LmHus1 e os testes a radiação-gamma e peróxido de hidrogênio. (A) O transfectante LmHus1 (•), a linhagem LT252 selvagem ( $\odot$ ) e o transfectante pXG1 ( $\Delta$ ) na fase inicial da log de crescimento, 3,0x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>, foram irradiados na dose de 500Gy (grays) de radiação gamma e o crescimento foi monitorado diariamente. (B) O cariótipo molecular das linhagens selvagem (*WT*), transfectante pXG1 (*pXG1*) e transfectante LmHus1 (*LmHus1*) foram analisadas por PFGE corrida longa, nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120 horas após irradiação gamma. O padrão Lambda ladder PGFE está representado no tamanho 727,5kbp. (C) O transfectante LmHus1 (•), a linhagem selvagem ( $\odot$ ) e o transfectante pXG1 ( $\Delta$ ) foram cultivados na presença de concentrações variadas de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Os valores são estatísticamente diferentes, \*test-t P>0,01.

#### 4.6 LmHus1 e sua expressão durante o ciclo de vida do parasito

A expressão da LmHus1 durante o ciclo de vida do parasito foi inicialmente investigada no transfectante GFP::LmHus1. Neste experimento, a linhagem foi cultivada até o quarto dia da fase estacionária (8 dia após inóculo de 2,0x10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup>), neste dia foi adicionado lectina de amendoim para concentração final de 100µg.mL<sup>-1</sup>. Após adição da lectina, a cultura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 30 minutos, tempo necessário para interação das lectinas com açúcares de superfície do parasito nas formas procíclicas, formando agregados (Sacks e Da Silva, 1987; Cunningham, Titus *et al.*, 2001). Em seguida, as formas metacíclicas foram separadas das formas procíclicas por centrifugação. As duas formas do parasito foram analisadas em ensaios de fluorescência (figura 8). Na figura 8A, as imagens de microscopia mostram que apenas as formas procíclicas expressam a fusão GFP::LmHus1. Este mesmo padrão é observado na análise de citometria (figura 8B).



**Figura 8. As formas metacíclicas e procíclicas do tranfectante GFP::LmHus1** foram analisadas por citometria de fluxo (**B**) e por microscopia confocal SP5 (**A**). As barras estão representadas na escala de 5µm. Estas análises detectaram a proteína de fusão GFP::LmHus1 exclusivamente no núcleo das formas procíclicas.

#### 4.7 LmHus1 possivelmente está envolvida em amplificação gênica em L. major

Na tentativa de associar a função de LmHus1 com o fenômeno de amplificação gênica no parasito, utilizamos a linhagem E12, a qual contém a marca SAT integrada no gene LmjF23.0310 contido no locus H amplificável (Augusto, Squina *et al.*, 2004). A linhagem E12 foi transfectada com o DNA pXGHUS1 e os

clones transfectantes (E12LmHus1) foram selecionados na presença de 40µg.mL<sup>-1</sup> de nourseotricina (SAT) e 8 µg.mL<sup>-1</sup> de G418. As linhagens E12 e E12LmHus1 foram inoculadas a densidade de 2x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup> na presença de 400 µg.mL<sup>-1</sup> de SAT. As culturas, ao atingirem a fase log-tardia, foram clonadas em meio M199 1X semisólido na presença de 800µg.mL<sup>-1</sup> de SAT e no caso do E12LmHus1 também na presença de 16µg.mL<sup>-1</sup> de G418. Após a seleção, o DNA cromossomal da linhagem foi extraído e separado por eletroforese em campo pulsado (PFGE) de corrida longa e curta, e em seguida submetida à hibridação com sonda específica para SAT (representada na figura 9). Pode-se observar na figura 9A, que os clones E12LmHus1 apresenta uma diferença entre os amplicons gerados comparado aos clones E12. As bandas referentes a amplificações são mais intensas na linhagem E12LmHus1 comparadas àquelas na E12, um indicativo de maior número de cópias epissomais relacionado à expressão de LmHus1. Além do número de cópias, o E12LmHus1 apresenta um padrão de várias bandas, evidenciadas tanto no PFGE corrida longa (figura 9A) ou curta (figura 9B).



**Figura 9. LmHus1 e amplificação gênica.** *Southern*, usando sonda SAT, do DNA cromossomal separado por PFGE corrida longa **(A)** e corrida curta **(B)** do E12(8)5 transfectado com pXG1LmHus1 (E12LmHus1) (painel à direita em A) e a linhagem E12 (painel à esquerda de A), depois do tratamento com 400µg.mL<sup>-1</sup> da droga de seleção SAT, cada painel representa 9 clones, no caso da linhagem E12 A são 8 clones. **(A, B)** Painéis abaixo representam o gel corado com brometo. O padrão Lambda ladder PGFE está representado no tamanho 727,5kbp **(A)** e 48,5kbp **(B)**. As setas indicam as bandas epissomais.

#### 4.8 Expressão heteróloga da LmjF07.0900 (Chk1-like) e produção de anticorpo

Em levedura e mamíferos, Chk1 é uma proteína quinase efetora da resposta de dano no DNA (Durkin, Arlt *et al.*, 2006; Paparatto, Fletcher *et al.*, 2009). Em situações de estresse no DNA, que envolva o complexo 9-1-1/Rad17 como sensor, a Chk1 é ativada e desencadeia o processo de reparo na célula (esquema na figura 10A) (Chen e Sanchez, 2004). Assim, análises *in silico* foram feitas em busca da Chk1 de *L. major*. Os resultados obtidos sugerem uma candidata a Chk1 de *L. major*, a LmjF07.0900 (LmChk1), pela identidade de 34% e homologia de 56% com a seqüência da proteína de levedura (apêndice III). Então, após a identificação, a LmChk1 foi expressa em bactéria *Escherichia coli*, purificada e utilizada na produção de anticorpo.

A estratégia foi compreendida na geração de uma proteína de fusão entre o gene LmChk1 e a *tag* de Histidina (His) contido no vetor pET28a. A clonagem do gene no vetor em questão foi confirmada por análise de restrição e também através de seqüenciamento (dados não mostrados). Esta construção, pET28aLmChk1, foi transformada em *E. coli*, linhagem BL21. Três clones foram analisados quanto à eficiência de indução da proteína heteróloga LmChk1, e um deles foi escolhido como o clone de trabalho. A expressão da proteína de 33,6kDa aconteceu na condição de 25°C; 0,1mM de IPTG, a 180rpm por 4h (figura 10B). Em seguida, através de centrifugação à separação das frações do extrato total de proteínas, vimos que esta se apresentava tanto na forma solúvel quanto insolúvel (figura 10C). Portanto, a fração solúvel foi utilizada na purificação da LmChk1 heteróloga utilizando coluna de níquel (Ni), onde a figura 10D mostra a proteína purificada apresentando ótimo rendimento.

Após a obtenção da LmChk1 recombinante purificada, a produção do anticorpo foi realizado com 4 aplicações de 1mg da proteína purificada em coelho, no período de 8 semanas. O soro obtido foi testado em ensaio de *western blot*, na diluição de 1:1000, utilizando extrato total de proteínas da bactéria induzida, o que confirmou a eficiência do anti-LmChk1 (figura 10E).

48



**Figura 10. Expressão e purificação da proteína recombinante LmjF07.0900. (A)** Esquema da via que envolve o complexo 9-1-1 ativando Chk1 na resposta a dano no DNA. Em levedura e mamíferos, a Chk1 desenvolve importante papel no reparo de DNA e controle do ciclo celular. **(B)** A possível Chk1 de *L. major* foi identificada, LmChk1 (*LmjF07.0900*), clonada no vetor pET28a e expressa (I) em BL21de3 rossetta *E. coli.* **(C)** Seguindo a indução a 25°C usando 0,1 mM IPTG, a 33,6 LmChk1 proteína de kDa foi detectada na fração solúvel (S). **(D)** A proteína, fusionada a tag de Histidina, foi purificada do extrato de bactéria usando Ni-beads (E3-E6). A proteína recombinante LmChk1 foi usada na produção de anticorpo em coelhos, **(E)** *Western blotting* usando anti-LmChk1 (diluição do soro 1:1000), (T) extrato total bactéria induzida e (Pu) LmChk1 recombinante purificada. As setas indicam as bandas da proteína LmChk1.

## 4.9 Geração do transfectante LmCHK1

A possível Chk1 de *L. major* depois de identificada, o gene que a codifica foi isolado do genoma por PCR, pela ex- aluna de iniciação científica Nathalia Martinez, e clonado no pGEM-teasy (apêndice IIa). A partir do pGEM*LmCHK1*, o gene foi liberado do vetor por restrição, e a banda referente ao *LmCHK1* foi ligada no pXG1 linearizado também por restrição. Na figura 11A, a confirmação do clone pXGCHK1 foi baseado no padrão de bandas gerada pela disgestão *Pvu*II (Biolabs), nos tamanhos 4309, 1271, 912 e 725pb. Posteriormente, no seqüenciamento do clone confirmou as seqüências do *LmCHK1*. O clone foi transfectado na linhagem LT252 selvagem do parasito, e a cultura transfectada foi clonada, porém não foi testada quanto a resistências a drogas genotóxicas.

Em adição, o anti-LmChk1 produzido revelou, no extrato total da linhagem selvagem, uma banda de 33kDa referente ao tamanho esperado (figura 11B). Baseado na hipótese de que LmChk1 seja a quinase de resposta a dano, modificações na proteína como fosforilações (Zhao e Piwnica-Worms, 2001) foram investigadas. A linhagem selvagem foi cultivada até a fase mid-log de crescimento (6x10<sup>6</sup>células.mL<sup>-1</sup>) e neste ponto, foi adicionado à cultura 10mM de HU e após 24 horas na presença da droga, extraímos as proteínas utilizando no tampão de lise contendo inibidores de fosfatase. Portanto, na figura 11B, no experimento de *western* vimos que a LmChk1 não apresentou padrão de banda maior que 33kDa que pudesse representar fosforilações na proteína. Ainda, na tentativa de identificar possível fosforilação na LmChk1, nos utilizamos o anticorpo anti-serina 345, de humano, que é sítio de ativação da Chk1 (Zhao e Piwnica-Worms, 2001), e tanto procedimento de ELISA quanto western não revelou para o extrato protéico do parasito utilizando anti-ser345 de humano (dados não mostrados).



**Figura 11.** Análise de restrição da clonagem de *LmChk1* e a proteína endógena. Figura do gel apresentando os padrões de bandas gerados pela digestão dos clones com a enzima *PvulI.* (A) O padrão do produto da digestão, 4309, 1271, 912 e 725pb, confirma a clonagem do DNA pXGCHK1. O marcador de peso molecular DNA Lambda digerido com *Hind*III está representado de 0,5 a 4,3kb e o DNA corado com brometo. (B) Western usando anti-LmChk1 (diluição do soro 1:50), extrato total de *L. major*. A banda de 33kDa indica a proteína LmChk1, (+) tratada ou (-) não tratada com 10mM of HU. Anti-GAPH foi usado como controle.

#### 4.10 Ruptura de um dos alelos do LmHUS1

Para gerar um mutante LmHus1 heterozigoto, utilizamos estratégia de ruptura gênica por inserção do transposon mariner /NEO\*SAT (Augusto, Squina et al., 2004) na porção 5' do LmHUS1. Nesta estratégia o transposon foi inserido em uma reação in vitro no gene LmHUS1 previamente clonado. A partir disso foi gerado o reagente de ruptura por recombinação que foi transfectado no parasito. O transposon /NEO\*SAT é um elemento de aproximadamente 1700 pares de base (pb), que contem como marca de seleção os genes streptotricina acetil transferase (SAT) e neomicina fosfotransferase (NPT) (NEO). Portanto, o fragmento de ruptura do LmHUS1, nomeado HUS1::NEOSAT, foi amplificado por reação de PCR, utilizando os iniciadores LT185 e LT188 (apêndice IV). Deste modo, o produto da PCR que gerou o fragmento HUS1::NEOSAT é constituído de aproximadamente 900pb das UTRs flanqueando o gene interrompido pelo transposon /NEO\*SAT possui 4436pb. Cerca de 5µg do HUS1::NEOSAT foi transfectado na linhagem LT252 selvagem e a seleção do transfectante foi feita com a droga nourseotricina (SAT) na concentração final de 40µg.mL<sup>-1</sup>. Em seguida, foram cultivados em meio M199 1X semi-sólido na presença de 80µg.mL<sup>-1</sup> de SAT e clonados. Foram obtidos 8 clones cultivados em meio M1991X líquido na presença de 40µg.mL<sup>-1</sup> de SAT. Um destes clones foi escolhido para caracterização e nomeado de mutante LmHus1. A integração do HUS1::NEOSAT no genoma foi identificada pela análise de southern do cariótipo molecular da linhagem mutante LmHus1. Nesta análise o DNA cromossomal da linhagem foi extraído e separado por eletroforese em campo pulsado (PFGE) de corrida longa e corrida curta, e em seguida submetida à hibridação com sondas específicas para SAT, NEO e LmHUS1 (as sondas estão representadas na figura 12A). Como pode ser observado na figura 12B, as bandas cromossômicas foram separadas e apresentaram o perfil eletroforético esperado. A análise de Southern da eletroferese de campo pulsado corrida longa sugere a possível localização da integração do HUS1::NEOSAT em banda cromossômica equivalente ao cromossomo 23 (~800 kbp). Portanto, para investigar tal evento, a análise de Southern da eletroferese de campo pulsado corrida curta, na figura 12C, mostra que a integração do HUS1::NEOSAT não se encontra na forma epissomal. Além disso, o

vetor pELHYGH2::/NEOELSAT (Augusto, Squina et al., 2004), que foi utilizado como molde para geração do fragmento HUS1::NEOSAT, poderia ser um contaminante no processo de transfecção. Para descartar esta possibilidade, HYG (higromicina), que é a marca do vetor; foi sondada utilizando os iniciadores LT201 e LT202 (apêndice IV). Na figura 12G pode-se observar que HYG não foi amplificada no mutante LmHus1, indicando que a linhagem não carrega este vetor. A marca SAT, parte integrante do transposon /NEO\*SAT, também foi detectada no mutante através de PCR, os iniciadores utilizados foram LT240 e LT241 (apêndice IV) (figura 12F). O fragmento HUS1::NEOSAT integrou na posição esperada no genoma do mutante LmHus1, confirmado pelo produto de aproximadamente 1900pb na figura 12E. Para tanto, foram utilizados os iniciadores LT111 (apêndice IV) que anela a 5' da marca SAT dentro da HUS1::NEOSAT e LT192 (apêndice IV), que anela à 3'do gene TTRS o qual se encontra a montante da posição desejada porém não faz parte da integração. Ainda, a elucidação de que apenas um dos alelos foi interrompido foi determinada utilizando os iniciadores LT150 e LT106 que, respectivamente, anelam a 5' e 3' do gene LmHUS1. Podemos observar na figura 12D, que a reação amplifica dois produtos no padrão esperado, onde um indica a cópia intacta, de aproximadamente 1000pb e outro indica a cópia interrompida do gene de aproximadamente 2700pb.



Figura 12. O Alelo do gene LmHus1 interrompido. (A) Representação esquemática da ruptura de um dos alelos do LmHus1, contendo o transposon modificado Mos1 /NEO\*SAT (Augusto, Squina et al., 2004). As setas representam os cassetes de seleção neomicina fosfotransferase (NPT) (NEO) e streptotricina acetil transferase gene (SAT); gene LmHUS1; AG, sítio aceptor de trans-splicing de Leishmania; hus, sat, neo representam as sondas usadas nos Southerns. (B) O LmHus1 interrompido foi investigado por Southern analysis do DNA cromossomal separado em eletroforese de campo pulsátil PFGE corrida longa. O padrão Lambda ladder PGFE está representado no tamanho 727,5kbp. (C) O LmHus1 interrompido foi investigado por Southern analysis do DNA cromossomal separado em eletroforese de campo pulsátil PFGE corrida curta. O padrão Lambda ladder PGFE está representado no tamanho 48,5kbp. (B,C) Nas raias estão representadas o gel corado com brometo (Bro), e as sondas usadas no Southern LmHUS1 (hus), SAT (sat) e NEO (neo). (D, E, F, G) Géis mostrando os produtos das reações de PCR à confirmação da integração do fragmento de ruptura do LmHUS1 no mutante (LmHus1+/-). DNA genômico da linhagem selvagem LT252 (WT) e DNA do vetor pELHYGH2::NEOSAT (H2::NEOSAT) foram usados como controle; Reação com DNA, positivo (+); e sem DNA, negativo (-), foram realizados. (D) Bandas de ~1000bp são produtos do LmHus1 intacto, enquanto que ~2700pb é o produto do gene interrompido. (E) Usando iniciadores 5' de SAT e 3' do gene TTRS, o produto de ~1900pb é referente a integração no locus H. (F) SAT foi amplificado somente na presença de /NEO\*SAT presente no mutante LmHus1, ~500pb. (G) Produto da higromicina (HYG), ~100bp, da marca do vetor pELHYG, foi observado somente no H2::NEOSAT.

Para analisar o efeito da ruptura de um dos alelos do *LmHUS1*, quanto aos níveis de expressão do gene, o extrato total do mutante LmHus1 foi submetido ao experimento de *western blot*, usando o soro anti-LmHus1 na diluição 1:2000 (Nunes, Damasceno *et al.*, 2011). Os extratos das linhagens LT252 selvagem e transfectante LmHus1 foram utilizados para comparação e o anti-tubulina como

controle. As linhagens foram cultivadas até a fase mid-log de crescimento (8,0x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>), no caso do transfectante e do mutante LmHus1 foram cultivados na presença, respectivamente, das drogas de seleção G418 (8µg.mL<sup>-1</sup>) e SAT (40µg.mL<sup>-1</sup>). Neste ponto do cultivo, extraímos as proteínas utilizando tampão de lise contendo inibidores de proteases. Os extratos foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose e esta foi utilizada no *western*. A figura 13A mostra a banda referente à LmHus1 em cada linhagem e ainda, para esclarecer a diferença de intensidade entre as bandas de LmHus1 foi utilizado o programa ImageJ versão 1.41 que possibilitou a quantificação dos pixels das bandas e mostrar a possível expressão diminuída da LmHus1 no mutante (figura 14B).



**Figura 13.** Análise da expressão de LmHus1 no mutante. (A) *Western* usando anti-LmHus1 (diluição do soro 1:2000), extrato total do mutante LmHus1 (LmHus1+/-) e das linhagens LT252 selvagem (LT252) e transfectante LmHus1 (LmHus1). A banda de 40kDa indica a proteína LmHus1. Anti-tubulina foi usado como controle. (B) Expressão relativa baseada na quantificação dos pixels das bandas da imagem do *western*, utilizando o programa ImageJ versão 1.41.

Visando avaliar se o efeito da ruptura do LmHus1 interfere no crescimento do parasito, foram feito inóculos 1x10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup> das linhagens mutante LmHus1, selvagem LT252, transfectante LmHus1 e transfectante pXG1 e o crescimento foi acompanhado diariamente. A linhagem mutante LmHus1 apresenta uma atraso no

crescimento, pois a cultura mantém-se na densidade de 2,0x10<sup>6</sup> células.mL <sup>-1</sup> durante 18 dias após o inóculo, enquanto que as linhagens controles chegam a logtardia em 4 dias (figura 14). O crescimento do mutante LmHus1 também foi acompanhado na ausência de nourseotricina e, mesmo assim, apresentou atraso no crescimento.



**Figura 14. Curva de crescimento do mutante LmHus1.** O mutante LmHus1 na presença (•) e na ausência (•) da droga de seleção SAT ( $40\mu g.mL^{-1}$ ), a linhagem selvagem LT252 (•), o transfectante LmHus1 (•) e o transfectante pXG1 ( $\Delta$ ) foram inoculados a  $1x10^{5}$  células.mL<sup>-1</sup> em meio M1991X e monitorados diariamente até a log-tardia de cada linhagem.

O mutante LmHus1 foi testado quanto à resistência às drogas HU e MMS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e etoposida. A droga etoposida é inibidora de topoisomeraseII, a qual participa de eventos de replicação de DNA. A linhagem LT252 selvagem foi utilizada como controle. Como apresentado na figura 15, o mutante LmHus1 não se apresentou diferente da linhagem selvagem às drogas HU e MMS, quando comparado a linhagem selvagem. Por outro lado, no caso dos testes a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e etoposida o mutante LmHus1 mostrou-se mais sensível quando comparado a linhagem selvagem.



**Figura 15. Curvas de resistências do mutante LmHus1 a drogas genotóxicas.** O mutante LmHus1 (•) cultivado na presença de concentrações variáveis das drogas hidróxiureia (A), metil metanosulfonato (MMS), (B) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), (C) comparado a linhagem LT252 selvagem ( $\circ$ ).

**DISCUSSÃO** 

#### 5. Discussão

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste projeto mostraram que a LmHus1 está envolvida no reparo de dano no DNA. A caracterização do *LmHUS1* iniciou-se com a determinação da localização nuclear do seu produto fusionado ao gene repórter GFP. A localização nuclear foi confirmada usando-se o anti-LmHus1. Além disso, a distribuição de alfa-hélices e folhas-beta ao longo da proteína é comparável entre as proteínas LmHus1 e Hus1. Este dado sugere uma possível conservação dos domínios PCNA-*like* (Nunes, Damasceno *et al.*, 2011), que podem mediar a participação no metabolismo de DNA.

A proteína Hus1, já caracterizada em mamíferos e levedura, está envolvida em vários tipos de reparo de DNA - principalmente as que geram simples fita de DNA (ssDNA) - e interage com as proteínas Rad9 e Rad1. Esta interação forma um complexo (complexo 9-1-1) que se liga ao complexo Rad17-Rfc<sub>2-5</sub>, que posiciona o 9-1-1 no local de dano do DNA (Sancar, Lindsey-Boltz et al., 2004; Medhurst, Warmerdam et al., 2008; Sohn e Cho, 2009). Buscas no banco de dados do genoma de Leishmania, o tritrypDB, não revelaram os genes das proteínas LmRad1 ou LmRad9, que comporiam com LmHus1 o complexo 9-1-1 no parasito. A divergência de seqüência observada entre os genes que já foram funcionalmente caracterizados em outros organismos pode explicar o fato de não ter sido possível identificá-los in silico em Leishmania. Por exemplo, os genes Dcd1 e Rad17 de S. cerevisiae, que codificam estes dois membros do complexo 9-1-1, não apresentam identidade de seqüência quando comparados aos genes de S. pombe (Kondo, Matsumoto et al., 1999). Por outro lado, homólogos dos componentes do complexo Rad17- Rfc<sub>2-5</sub>, envolvido no reparo do DNA, foram encontrados no genoma do parasito (dados não mostrados).

O estudo de uma linhagem transfectante que apresenta expressão aumentada deste gene permitiu associá-lo a mecanismos de reparo do DNA. Observando que, o perfil de crescimento do transfectante LmHus1 foi analisado e mostrou-se comparável àquele da linhagem selvagem. Portanto, a expressão aumentada de LmHus1 não deve comprometer as funções celulares básicas do parasito (Nunes, Damasceno *et al.*, 2011). O nível de transcritos do gene *LmHUS1* foi

59

analisado por *northern blotting* e PCR em tempo real, que mostraram que o nível de transcritos do gene no transfectante LmHus1 apresenta-se aumentado. Na análise de *northern*, o nível basal do transcrito do *LmHUS1* não foi detectado na linhagem LT252 selvagem e no transfectante pXG1 (linhagem que carrega o plasmídeo pXG1 vazio). Nestas linhagens, a expressão do gene em nível de transcritos é baixa e estão abaixo do nosso limite de detecção. Por outro lado, transcritos do gene são observados nas linhagens transfectantes LmHus1, GFPLmHus1 e na LmHus1Myc e os níveis destes transcritos estão aumentados.

Os experimentos que se seguiram tiveram por objetivo investigar o envolvimento de LmHus1 no reparo do DNA como descrito em mamíferos e na levedura (Canman, 2001). Assim, analisamos o comportamento do transfectante LmHus1 submetido a perturbações no evento de replicação, como por exemplo, através do tratamento com hidroxiuréia (HU). Esta droga atua na diminuição do *pool* de dNTPS na célula levando à parada nos eventos de replicação. Condizente com a atuação de LmHus1 na resposta à parada de replicação no parasito, o transfectante mostrou-se consideravelmente resistente à hidroxiuréia. Em leveduras, uma linhagem nocaute para a proteína Hus1 apresenta-se mais sensível ao tratamento com hidroxiuréia. Além disso, quando a expressão do gene foi aumentada, observa-se o aparecimento de resistência ao tratamento com hidroxiuréia (Caspari, Dahlen *et al.*, 2000).

Em adição, o transfectante também apresentou resistência à droga metil metanosulfonato (MMS), que metila o DNA na N<sup>7</sup>-deoxiguanina e N<sup>3</sup>-deoxiadenina, desestruturando-o, o qual tanto perturba a replicação do DNA quanto gera quebras. Por outro lado, não evidenciamos resistência do transfectante LmHus1 a droga fleomicina, classificada como radiomimética e que é um glicopeptídeo que interage com DNA causando sua desestruturação. Também, o transfectante LmHus1 foi exposto à radiação gamma que gera quebras de dupla fitas do DNA. Os resultados sugerem que LmHus1 não participa na detecção e/ou reparo de quebras de dupla fita. Além disso, a análise do cariótipo por PFGE mostrou que a integridade do DNA cromossomal do transfectante LmHus1 foi comparável aos controles. Os resultados de resistência a fleomicina e recuperação a exposição a raios gamma estão de acordo pois, nos dois casos, geram quebras de dupla fita no DNA (DSBs).

60

Assim, os dados obtidos com as resistências do transfectante LmHus1, são compatíveis com o cenário em que Hus1 medeia resistências envolvendo reparo de quebras que expõem ssDNA através de ativação de *checkpoint* dependente da quinase ATR. A via que tem ATR como sensor, é modulada e ativada pela interação de ATR com 9-1-1 via TopBP1 (Delacroix, Wagner *et al.*, 2007; Lee e Paull, 2007). Por outro lado, DSBs estão relacionadas a via que envolve ATM como sensor, e a ativação desta via não depende, via de regra, do complexo 9-1-1 (Weiss, Matsuoka *et al.*, 2002). Portanto, os resultados discutidos acima sugerem que LmHus1 está relacionada ao reparo de danos de ssDNA e estresse replicativo e não no reparo de quebras de dupla fita de DNA em *Leishmania spp*.

Apesar da perda do epissomo pXGHus1 pelo transfectante LmHus1 reverter o fenótipo de resistência à HU, MMS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; e a linhagem que carrega o vetor pXG1 vazio não apresentar resistência a estas drogas, consideramos a possibilidade de que as linhagens estudadas poderiam apresentar uma maior eficiência no metabolismo ou extrusão da droga que justificassem os fenótipos de resistências observadas. Então, investigamos a capacidade de recuperação do transfectante LmHus1 após tratamento por HU. O transfectante LmHus1 apresentou uma capacidade maior de recuperação do tratamento por HU quando comparado aos controles. Além disso, observamos que, após 48 horas do tratamento com HU, os perfis de marcação de 3'-OH livres das linhagens selvagem LT252 e transfectante LmHus1 são diferentes. Cerca de 40% das células do transfectante LmHus1 expostas à HU eram comparáveis a células não expostas à HU. Por outro lado, até 90% das células da linhagem selvagem expostas à HU apresentaram níveis de fragmentação do DNA comparáveis às células que foram tratadas com DNase. Assim, a melhor recuperação do crescimento e a menor fragmentação do DNA na linhagem LmHus1 sugere que a superexpressão de LmHus1 confere resistência observada por ativar em mecanismos de detecção e de reparo, não em mecanismos inespecíficos de resistência a drogas.

Considerando o papel do complexo 9-1-1 e o ciclo de vida deste parasito, caracterizado pela passagem por ambiente oxidativo (Mcconville, De Souza *et al.*, 2007), testamos o transfectante LmHus1 no tratamento com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que oxida bases do DNA e ativa a via de excisão de bases (BER,

base excision repair). Este tipo de dano é reconhecido por MutS, MutH e MutL e o reparo envolve polimerase-beta e glicosilases como OGG1 e Fpg (Robertson, Klungland *et al.*, 2009; Bai, Madabushi *et al.*, 2010). O transfectante LmHus1 mostrou-se resistente e este resultado sugere a possível participação da LmHus1 na via BER, podendo desempenhar um importante papel na infecção do parasito *Leishmania spp.* O possível envolvimento de LmHus1 com BER é esperado, uma vez que, em humanos, o complexo 9-1-1 interage com a enzima Timina DNA Glicosilase (TDG) que tem um papel chave na via BER, a qual encontra lesões no DNA, como bases oxidadas thimina glicol; 5-formil-U; 5-hidroxi-U e 5-hidroxi-metil-U, e promove excisão destas bases (Guan, Madabushi *et al.*, 2007) e ainda, a estrutura tridimensional dos componentes do complexo 9-1-1 propõe que este complexo ligase ao dano no DNA durante o controle *checkpoint* e serve como plataforma para BER (Sohn e Cho, 2009). No entanto, nossos resultados sugerem a distribuição da expressão de LmHus1 nas formas metacíclicas infectivas. Será importante determinar a expressão da proteína em formas amastigotas.

O grau de insucesso no tratamento da leishmaniose envolve fatores do paciente, mas também pode estar relacionada a fatores mediados pelo parasito. Assim, *Leishmania* pode apresentar resistência a drogas não relacionadas em decorrência da amplificação de genes específicos. A amplificação gênica é um fenômeno importante na biologia destes protozoários. O aumento do número de cópias de genes e/ou seqüências relevantes pode ser um fator determinante na geração de diversidade e, portanto, na evolução destes organismos (Akopyants, Kimblin *et al.*, 2009). Além disso, a possibilidade de modular o número de cópias de genes de forma transitória pode ser um fator importante na regulação da expressão gênica em um organismo que caracteristicamente não regula seus genes no processo de transcrição (Borst, 1986; Lebowitz, Smith *et al.*, 1993).

O *LmHUS1* é codificado em um locus passível de amplificação gênica, a região H, contida no cromossomo 23 de *L. major*. A formação de amplicons a partir do locus H de *L. major* e *L. tarentolae* tem sido bem estudada e ocorre quando linhagens destas duas espécies são submetidas à pressão por diferentes drogas (Ellenberger e Beverley, 1989; Callahan e Beverley, 1991; 1992; Grondin, Roy *et al.*, 1996; Grondin, Kundig *et al.*, 1998). Esta não é uma característica comum a todas as

62

espécies do parasito. Em *L. braziliensis*, uma espécie do subgênero *Viannia*, a amplificação deste locus não é favorecida quando submetida às mesmas condições de stress. Esta diferença pode ser atribuída a uma organização diferente de seqüências repetitivas que possivelmente participam da amplificação do locus, ou à presença da maquinaria de RNA de interferência (Dias, Ruiz *et al.*, 2007)(Lye, Owens *et al.*, 2010). Assim, mesmo que o mecanismo molecular de amplificação da região H não esteja ainda totalmente elucidado, está claro que este fenômeno é determinante dos fenótipos de resistência a drogas associados a este locus. Estas evidências são tanto mais interessantes quando consideramos que o gene estudado é codificado em um locus passível de ser amplificado e poderia participar nos eventos moleculares de geração de amplicons.

Desta forma, é interessante especular que LmHus1, além de desempenhar um papel importante na manutenção da integridade do genoma de *Leishmania*, pode estar envolvida na regulação do fenômeno de formação de amplicons neste protozoário. Uma linhagem que contém a marca SAT integrada no genoma, no locus amplificável H (Augusto, Squina *et al.*, 2004) e com a expressão aumentada da LmHus1 (E12LmHus1), mostrou-se mais profícua na produção de amplicons. É importante ressaltar, que o estudo precisa ser repetido incluindo a linhagem LT252 selvagem controle e será necessário também caracterizar os amplicons observados para determinar sua origem. Contudo, mesmo que preliminares, estes resultados sugerem que LmHus1 participe na formação de amplicons em *L. major*.

Nossos resultados sugerem que LmHus1 possa participar na manutenção do genoma e no controle da expressão gênica, tais como mecanismos de reparo de DNA e amplificação gênica, e na sua interação com os ambientes tão diversos encontrados durante seu ciclo de vida. Estes processos ativam uma rede de sinais intracelulares que envolvem a ativação de quinases. Assim, investigamos a possível quinase envolvida com funções onde LmHus1 parece atuar. Em outros organismos, ATR está envolvido na iniciação do sinal através da fosforilação da quinase Chk1 efetora do sinal durante respostas a alguns tipos de danos no DNA (Weiss, Matsuoka *et al.*, 2002; Medhurst, Warmerdam *et al.*, 2008), e baseado nos resultados até agora alcançados, provavelmente a via de reparo que envolve Hus1 e Chk1 na manutenção da integridade do DNA exista no parasito. O gene *Lmj07.0900* 

foi identificado como possível Chk1 de *L. major* (LmChk1), baseado homologia de seqüência com a quinase Chk1 de *S. cerevisiae*. O anticorpo anti-LmChk1 recombinante detectou a possível LmChk1 no extrato total da linhagem LT252 selvagem. No entanto, o tratamento com HU não levou a alterações detectáveis que pudessem sugerir, por exemplo, fosforilação da Chk1 em reposta ao estresse por HU. Ensaios de fracionamento celular e imunofluorescência sugeriram uma localização citoplasmática para LmChk1 (dados não mostrados), Porém, será importante investigar a localização na situação de dano no DNA, em que pode acontecer uma relocação da proteína do citoplasma para o núcleo. Como visto em mamíferos, durante a transição no ciclo celular onde a Chk1 é relocada do citoplasma para o núcleo (Enomoto, Goto *et al.*, 2009).

Uma possível limitação do nosso estudo é o uso de uma linhagem em que LmHus1 é superexpresso. Considerando que a formação do complexo 9-1-1 seja dependente de níveis celulares de cada um dos seus componentes, o desbalanço causado pelo excesso de LmHus1 poderia interferir na função normal de um complexo. Neste sentido, um mutante foi gerado onde uma cópia do gene foi interrompida, o mutante LmHus1. A fase de leitura foi interrompida pela integração do transposon /NEO\*SAT na porção 5' do gene.

O mutante apresenta uma possível diminuição nos níveis da LmHus1 quando comparado a linhagem LT252 selvagem. A diminuição da expressão da LmHus1 interfere no crescimento do mutante, que apresenta uma atraso no crescimento, pois a cultura mantém-se na densidade de 2,0x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup> durante 18 dias após o inoculo de 1,0x10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup>, enquanto que as linhagens controles chegam a log-tardia em 4 dias. O crescimento do mutante LmHus1 também foi acompanhado na ausência de nourseotricina e, mesmo assim, apresentou atraso no crescimento. Além disso, a cultura da linhagem mutante tem um aspecto diferente, pois apresenta uma formação precoce de rosetas quando comparado às linhagens controles (dado não mostrado). Recentemente, a formação de rosetas foi implicada como sendo mais uma fase do ciclo celular de *Leishmania spp.* (Iovannisci, Plested *et al.*, 2010). Considerando esta informação e estes resultados, é possível que a LmHus1 esteja envolvida no controle do ciclo celular do parasito.

64

Finalmente, o mutante LmHus1 não se apresentou diferente da linhagem selvagem às drogas HU e MMS, quando comparado a linhagem selvagem. Por outro lado, no caso do teste a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o mutante LmHus1 mostrou-se sensível quando comparado a linhagem selvagem. Além disso, uma discreta sensibilidade é observada do mutante LmHus1 a etoposida quando comparado a linhagem selvagem, e apesar de não ser estatisticamente diferente, o perfil visto na resistência pode ser o efeito da interrupção do gene LmHus1. Uma explicação plausível para os fenótipos observados nas resistências a HU e MMS e etoposida é que uma cópia do gene ainda está intacta e isso deve suprir a necessidade de LmHus1 na célula, e a obtenção de mutante nulo irá esclarecer melhor a efeito da falta de LmHus1 nestas resistências. Portanto, uma linhagem nula para o gene *LmHUS1*, será uma ferramenta valiosa para estudos funcionais e caracterização da LmHus1 no parasito.

Utilizando diferentes abordagens demonstramos que a expressão aumentada da LmHus1 confere vantagem ao parasito em situação de dano ao DNA ou interferência no processo de replicação. A ruptura de uma cópia do gene afetou o crescimento e a resistência a drogas do parasito. Assim, acreditamos que o produto deste gene desempenha funções semelhantes àquelas da proteína Hus1 caracterizada em mamíferos e na levedura (Sancar, Lindsey-Boltz *et al.*, 2004). Este estudo permite especular se LmHus1, além de desempenhar um papel importante na manutenção da integridade do genoma de *Leishmania*, pode estar envolvida na regulação do fenômeno de formação de amplicons e, portanto, pode participar em processos de regulação da expressão de genes neste protozoário.

<u>APÊNDICES</u>

## 6. Apêndices

## 6.1 Apêndice I

## Ia - Seqüência do gene LmHUS1 (LmjF23.0290), 996pbs.

## LmjF23.0290

ATGCGCTTCAAGGCGACCCTCAAGGACGCTAAGGGCCTGCTTGGTGTTCTGCAGGTG TGCCGCAGTATTCAACGTGACTGTATCGTGCGCCTGCAGTCCGAGCGCATCCGCTTC TTCTCGAACACGAACGCCGCAGATGGGGTGCAGGTGTGGATGCGATGCCAGTCGTCG TTTCTCTTCTACGAGATGGTCTGCGACTCCGGCTACGATGAGCACTCCATCACGTGC GAAGTACTCGACCTCGCACAGCTCATCCACATTGTAAAACAAGCAGAGGCGCGCGAG CGATCCCACCAAGGGACCACCTCACGTGTGCAGATGCGGTTGGCGCGCGAATGGACGG GACGTGCCGCTGCGCATCCTCGGGGGACCGTGAAATCCAGAGTCTGTCCCCGCCGCCG CTAGAGAGGCAGCACCTGCAGATTCTGGTGCCAGACATGCTAGAACTCACCACCTTC ATGCCGCCGACGCCGCGCGCGCGCGCGCAGAGGACGGTGAGGCCGAGGACGCCGATGGC GCTGTCGAACTGGTCGAGCAGCTGGAGAGGAGGACGGTGATGACGATGGCGATGAT GACGGCGGTGCCGTGGATGACGTTCGCGTGGCTACTGTCATGGTCGAGACGCGGAAG TTCGCGCGCTTCTTTTCGGCTGTGAAGGAGCTGGATCCGATGAAGATGAGCATGTAC TTGGTGGACCGCCGAGCACTCGTGCTTAGCGTGTTCGCAGTTGGGAACACCGCGATG GTAGCCTATATCCCCGCAAGGGCGTAG

Ib - Seqüência traduzida do gene *LmHUS1* (*LmjF23.0290*), 332 resíduos de aminoácidos.

## LmjF23.0290

MRFKATLKDAKGLLGVLQVCRSIQRDCIVRLQSERIRFFSNTNAADGVQVWMRCQS SFLFYEMVCDSGYDEHSITCEVLDLAQLIHIVKQAEARERSHQGTTSRVQMRLARNG RYPLWRVAMQGLSGQPDVSFDVPLRILGDREIQSLSPPPLERQHLQILVPDMLELTT FIDKLKNTAADSVTFSARVLMPPTPRRGAEDGEAEDADGGAEVRRGVKRPRDKDALP LASLLIYAEHFMARFSLKYEAVELVEQLEREDGDDDGDDDGGAVDDVRVATVMVETR KFARFFSAVKELDPMKMSMYLVDRRALVLSVFAVGNTAMVAYIPARA

## 6.2 Apêndice II - Vetores

## IIa – Vetor pXGHUS1

O vetor pXGHUS1 está representado abaixo e os sítios de restrição para a enzima *Pvu*II dispostos no vetor, além das suas marcas de seleção em bactéria; ampicilina (AMP), e no parasito; geneticina (G418) e as seqüências regulatórias necessárias à expressão em bactéria e no parasito.



## IIb – Vetor pXGGFPHUS1

O vetor pXGGFPHUS1 está representado abaixo e os sítios de restrição para as enzimas *Pvu*II, *BsrG*I e *BgI*II dispostos no vetor, além das suas marcas de seleção em bactéria; ampicilina (AMP), e no parasito; geneticina (G418) e as seqüências regulatórias necessárias à expressão em bactéria e no parasito.



## IIc – Vetor pXGHUS1MYC

O vetor pXGHUS1MYC está representado abaixo e os sítios de restrição para as enzimas *Pvull* e *BglII* dispostos no vetor, além das suas marcas de seleção em bactéria; ampicilina (AMP), e no parasito; geneticina (G418) e as seqüências regulatórias necessárias à expressão em bactéria e no parasito.



## IId – Vetor pGEM<sup>®</sup>-T easy (Promega).

Abaixo está representado o vetor pGEM<sup>®</sup>-T easy utilizado para a clonagem do gene *LmHUS1* a partir da reação de PCR com os iniciadores LT105 e LT106 (apêndice IV). Os detalhes do vetor estão mostrados os principais sítios de restrição e suas marcas de seleção ampicilina (AMP) e LacZ.



# 6.3 Apêndice III

# Alinhamento da seqüência da possível Chk1 de *L. major* (LmjF07.0900) e da proteína de levedura (<u>http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</u>).

LmjF07.0900/1-296 Scerevisae CHK 1/1-527	1  MSLSQVSPL	IO KRLGK <mark>Y</mark> ELG HIKDVVLG	20 RTLGTGNFS DTVGQGAFA	30 K <mark>vk</mark> iar-dte Cvknahlqmd	40 T <mark>g</mark> kewat <mark>k</mark> vt Pstilavkft
Lnij F07.0900/1-296 Scerevisae CHK 1/1-527	50 DKEQLV <mark>r</mark> ern HV <mark>p</mark> tck <mark>kmgl</mark>	60 1 1 E E Q L <mark>K</mark> R . S D K D I T <mark>K</mark> E	70 Elavm <mark>k</mark> mlr Vvlqskcski	80 2 <mark>PNIIELHE</mark> V H <mark>PN</mark> VLRLIDC	90 MQ <mark>T</mark> SH <mark>HIY</mark> LV NV <mark>S</mark> KEYMWII
LmjF07.0900/1-296 Scerevisae CHK 1/1-527	100 NLLL <mark>D</mark> ANDTI NILLDKN <mark>G</mark> N	110 L <mark>KI</mark> SAKRFD LKLADV <mark>gVD</mark>	120 E <mark>P</mark> TARHYFH SDVAQFYFQ	130 QLIC <mark>GINYCH</mark> QLVSAINYLH	140 R <mark>QG-IAHR</mark> DL VEC <mark>GVAHR</mark> DI
LmjF07.0900/1-296 Scerevisae CHK 1/1-527	150 Enllidand Enilldkng	160 T L <mark>K I S D F G L</mark> N L K L A D F G L	170 SNLQ <mark>R</mark> TSVS ASQF <mark>R</mark> RKD <mark>g</mark>	180 <mark>GGTMLQTVCG</mark> TLR <mark>V</mark> SMDQRG	190 TPNYVAPEVL SPPYMAPEVL
LmjF07.0900/1-296 ScerevisaeCHK1/1-527	200 E <mark>DGY</mark> D <mark>GLK</mark> A EEGYYAD <mark>R</mark> T	210 DIWSCGVVL DIWSIGILL	220 FVMMA <mark>G</mark> YLP FVLLT <mark>G</mark> QTP	230 FDDENVN WELPSLENED	) 240 IALFTKIERGE FVFFIENDGN
LmjF07.0900/1-296 ScerevisaeCHK1/1-527	250 MARHFSADA WGPWSKIEF	260 R - D L I S <mark>R</mark> M T H L N L L R <mark>K</mark> I	ILTVDPQE <mark>R</mark> I LQPDPNK <mark>R</mark> V	70 2 SLDDVIAHPW TLKALKLHPW	80 2 /FC /VLRRASFS <mark>G</mark> C
LmjF07.0900/1-296 Scerevisae CHK 1/1-527	300 VDWN <mark>P</mark> AMLT LCNDPELLA	3 	10 	320 <mark>G</mark> eshs Ftqdtnsnnr	330 S <mark>p</mark> nttoisna Syisto <mark>pign</mark> e
LmjF07.0900/1-296 Scerevisae CHK 1/1-527	350 NM ELEHDSMHF(	) 	360 	370 	380  AKWTQFISYD

# 6.4 Apêndice IV

Quadro	de	iniciadores

Nome do oligo	Alvo	Seqüência 5'-3'			
LT105*	LmHUS1 (F)	ttgTACagtATGcgcTTCaagGCGacc			
LT106*	LmHUS1 (R)	AGGggcGTTcccGCAtcgCCTctaGAc			
LT150*	LmHUS1Myc (F)	gaaGATctgTATgcgCTTcaaGGCgacc			
LT151*	LmHUS1Myc (R)	ctaGATctcTAGgcaTAGtctGGTacaTCAtacGGAtatCCCcttGCGgggATA			
LT189**	LmHUS1 (F)	aacTGAagaACAcggCAGccgATA			
LT190**	LmHUS1 (R)	tgaAGTgctCGGcgtAGAtga GAA			
LT185*	LmHUS1::NEOSAT (F)	aaaATAttaCGGaccGAGacgCGT			
LT188*	LmHUS1::NEOSAT (R)	ttgGGGcccTGTggaCCCttgGCGgc			
LT201*	HYG (F)	cgaAATtgcCGTcaaCCAagcTCT			
LT202*	HYG (R)	AGCaggTCGccaACAtctTCTtct			
LT240*	SAT (F)	accGCAattGTCcccCCCgggGGGaatttcGGtgaTCCctgAGCAGCAggtg			
LT241*	SAT (R)	catGGCgcgcctCCCCCgggGGGattaggcgtcaTCCtgtgCTCCCga			
LT111*	SAT(F)	tttCGGtgaTCCctgAGC			
LT192*	TTRS (R)	caaGCTtgcCGAcatTATcgcTGT			
T7***	pET28a (F)	taaTACgacTCActaTAggg			
LT157***	pXG1 (F)	ctcAACcacCCCtcaCTTtc			
LT158***	pXG1 (R)	accAAGacgGGCataAACac			
M13f***	pGEM (F)	GTTgtaAAAcgaCGGccaGT			
M13r***	pGEM (R)	cacAGGaaaCAGcagCTAtgaCC			
<ul> <li>*iniciadores utilizados para PCR convencional e tendo genes como alvo</li> <li>*iniciadores utilizados para PCR em tempo real e tendo genes como alvo</li> <li>**iniciadores utilizados para seqüenciamento e tendo regiões em vetores de expressão como alvo</li> <li>(F) iniciador <i>foward</i></li> <li>(R) iniciador <i>reverse</i></li> </ul>					

6.5 Apêndice V – Anotações da banca examinadora










## **REFERÊNCIAS**

### 7. Referências bibliográficas

Akopyants, N. S., N. Kimblin, *et al.* Demonstration of genetic exchange during cyclical development of Leishmania in the sand fly vector. <u>Science</u>, v.324, n.5924, Apr 10, p.265-8. 2009.

Al-Khodairy, F., E. Fotou, *et al.* Identification and characterization of new elements involved in checkpoint and feedback controls in fission yeast. <u>Mol Biol Cell</u>, v.5, n.2, Feb, p.147-60. 1994.

An, J., Y. C. Huang, *et al.* DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. <u>BMC Mol</u> <u>Biol</u>, v.11, p.18.

Augusto-Pinto, L., S. M. Teixeira, *et al.* Single-nucleotide polymorphisms of the Trypanosoma cruzi MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. <u>Genetics</u>, v.164, n.1, May, p.117-26. 2003.

Augusto, M. J., F. M. Squina, *et al.* Specificity of modified Drosophila mariner transposons in the identification of Leishmania genes. <u>Exp Parasitol</u>, v.108, n.3-4, Nov-Dec, p.109-13. 2004.

Bai, H., A. Madabushi, *et al.* Interaction between human mismatch repair recognition proteins and checkpoint sensor Rad9-Rad1-Hus1. <u>DNA Repair (Amst)</u>, v.9, n.5, May 4, p.478-87. 2010.

Bao, S., T. Lu, *et al.* Disruption of the Rad9/Rad1/Hus1 (9-1-1) complex leads to checkpoint signaling and replication defects. <u>Oncogene</u>, v.23, n.33, Jul 22, p.5586-93. 2004.

Barnes, R. L. e R. Mcculloch. Trypanosoma brucei homologous recombination is dependent on substrate length and homology, though displays a differential dependence on mismatch repair as substrate length decreases. <u>Nucleic Acids Res</u>, v.35, n.10, p.3478-93. 2007.

Berman, J. Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. <u>Curr Infect Dis Rep</u>, v.7, n.1, Jan, p.33-38. 2005.

Berman, J. D. e H. K. Webster. In vitro effects of mycophenolic acid and allopurinol against Leishmania tropica in human macrophages. <u>Antimicrob Agents Chemother</u>, v.21, n.6, Jun, p.887-91. 1982.

Bermudez, V. P., L. A. Lindsey-Boltz, *et al.* Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex in vitro. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u>, v.100, n.4, Feb 18, p.1633-8. 2003.

Beverley, S. M. Gene amplification in Leishmania. <u>Annu Rev Microbiol</u>, v.45, p.417-44. 1991.

Beverley, S. M., T. E. Ellenberger, *et al.* Primary structure of the gene encoding the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase of Leishmania major. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u>, v.83, n.8, Apr, p.2584-8. 1986.

Bohr, V. A., D. S. Okumoto, *et al.* Survival of UV-irradiated mammalian cells correlates with efficient DNA repair in an essential gene. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u>, v.83, n.11, Jun, p.3830-3. 1986.

Borst, P. Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. <u>Annu</u> <u>Rev Biochem</u>, v.55, p.701-32. 1986.

Cai, L., M. Roginskaya, *et al.* Structural characterization of human RPA sequential binding to single-stranded DNA using ssDNA as a molecular ruler. <u>Biochemistry</u>, v.46, n.28, Jul 17, p.8226-33. 2007.

Callahan, H. L. e S. M. Beverley. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in Leishmania. J Biol Chem, v.266, n.28, Oct 5, p.18427-30. 1991.

\_\_\_\_\_. A member of the aldoketo reductase family confers methotrexate resistance in Leishmania. J Biol Chem, v.267, n.34, Dec 5, p.24165-8. 1992.

Canman, C. E. Replication checkpoint: preventing mitotic catastrophe. <u>Curr Biol</u>, v.11, n.4, Feb 20, p.R121-4. 2001.

Carvalho, E. M., W. D. Johnson, *et al.* Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. <u>J Immunol</u>, v.135, n.6, Dec, p.4144-8. 1985.

Caspari, T., M. Dahlen, *et al.* Characterization of Schizosaccharomyces pombe Hus1: a PCNA-related protein that associates with Rad1 and Rad9. <u>Mol Cell Biol</u>, v.20, n.4, Feb, p.1254-62. 2000.

Chen, Y. e Y. Sanchez. Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. <u>DNA Repair (Amst)</u>, v.3, n.8-9, Aug-Sep, p.1025-32. 2004.

Coburn, C. M., K. M. Otteman, *et al.* Stable DNA transfection of a wide range of trypanosomatids. <u>Mol Biochem Parasitol</u>, v.46, n.1, May, p.169-79. 1991.

Coelho, A. C., S. M. Beverley, *et al.* Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in Leishmania major. <u>Mol Biochem Parasitol</u>, v.130, n.2, Aug 31, p.83-90. 2003.

Cruz, A. K., R. Titus, *et al.* Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in Leishmania by targeting. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u>, v.90, n.4, Feb 15, p.1599-603. 1993.

Cunningham, M. L., R. G. Titus, *et al.* Regulation of differentiation to the infective stage of the protozoan parasite Leishmania major by tetrahydrobiopterin. <u>Science</u>, v.292, n.5515, Apr 13, p.285-7. 2001.

Cupolillo, E., E. Medina-Acosta, et al. A revised classification for Leishmania and Endotrypanum. <u>Parasitol Today</u>, v.16, n.4, Apr, p.142-4. 2000.

Delacroix, S., J. M. Wagner, et al. The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. <u>Genes Dev</u>, v.21, n.12, Jun 15, p.1472-7. 2007.

Dias, F. C., J. C. Ruiz, *et al.* Organization of H locus conserved repeats in Leishmania (Viannia) braziliensis correlates with lack of gene amplification and drug resistance. <u>Parasitol Res</u>, v.101, n.3, Aug, p.667-76. 2007.

Do Monte-Neto, R. L., A. C. Coelho, *et al.* Gene Expression Profiling and Molecular Characterization of Antimony Resistance in Leishmania amazonensis. <u>PLoS Negl</u> <u>Trop Dis</u>, v.5, n.5, May, p.e1167.

Dominguez, M. e A. Torano. Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of Leishmania infection. J Exp Med, v.189, n.1, Jan 4, p.25-35. 1999.

Dore, A. S., M. L. Kilkenny, *et al.* Crystal structure of the rad9-rad1-hus1 DNA damage checkpoint complex--implications for clamp loading and regulation. <u>Mol</u> <u>Cell</u>, v.34, n.6, Jun 26, p.735-45. 2009.

Dumas, C., M. Ouellette, et al. Disruption of the trypanothione reductase gene of Leishmania decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. <u>EMBO J</u>, v.16, n.10, May 15, p.2590-8. 1997.

Durkin, S. G., M. F. Arlt, *et al.* Depletion of CHK1, but not CHK2, induces chromosomal instability and breaks at common fragile sites. <u>Oncogene</u>, v.25, n.32, Jul 27, p.4381-8. 2006.

Ellenberger, T. E. e S. M. Beverley. Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in Leishmania major. <u>J Biol Chem</u>, v.264, n.25, Sep 5, p.15094-103. 1989.

Emili, A. MEC1-dependent phosphorylation of Rad9p in response to DNA damage. <u>Mol Cell</u>, v.2, n.2, Aug, p.183-9. 1998.

Enoch, T., A. M. Carr, *et al.* Fission yeast genes involved in coupling mitosis to completion of DNA replication. <u>Genes Dev</u>, v.6, n.11, Nov, p.2035-46. 1992.

Enomoto, M., H. Goto, *et al.* Novel positive feedback loop between Cdk1 and Chk1 in the nucleus during G2/M transition. <u>J Biol Chem</u>, v.284, n.49, Dec 4, p.34223-30. 2009.

Featherstone, C. e S. P. Jackson. DNA double-strand break repair. <u>Curr Biol</u>, v.9, n.20, Oct 21, p.R759-61. 1999.

Feinberg, A. P. e B. Vogelstein. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. <u>Anal Biochem</u>, v.132, n.1, Jul 1, p.6-13. 1983.

Gaunt, M. W., M. Yeo, *et al.* Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. <u>Nature</u>, v.421, n.6926, Feb 27, p.936-9. 2003.

Glover, L. e D. Horn. Site-specific DNA double-strand breaks greatly increase stable transformation efficiency in Trypanosoma brucei. <u>Mol Biochem Parasitol</u>, v.166, n.2, Aug, p.194-7. 2009.

Grogl, M., A. M. Oduola, *et al.* Leishmania spp.: development of pentostamresistant clones in vitro by discontinuous drug exposure. <u>Exp Parasitol</u>, v.69, n.1, Jul, p.78-90. 1989.

Grondin, K., C. Kundig, *et al.* Linear amplicons as precursors of amplified circles in methotrexate-resistant Leishmania tarentolae. <u>Nucleic Acids Res</u>, v.26, n.14, Jul 15, p.3372-8. 1998.

Grondin, K., G. Roy, *et al.* Formation of extrachromosomal circular amplicons with direct or inverted duplications in drug-resistant Leishmania tarentolae. <u>Mol Cell</u> <u>Biol</u>, v.16, n.7, Jul, p.3587-95. 1996.

Guan, X., A. Madabushi, *et al.* The human checkpoint sensor Rad9-Rad1-Hus1 interacts with and stimulates DNA repair enzyme TDG glycosylase. <u>Nucleic Acids</u> <u>Res</u>, v.35, n.18, p.6207-18. 2007.

Hardy, L. W., W. Matthews, *et al.* Biochemical and Genetic Tests for Inhibitors of Leishmania Pteridine Pathways. <u>Exp Parasitol</u>, v.87, n.3, Nov, p.158-70. 1997.

Hopkins, K. M., W. Auerbach, *et al.* Deletion of mouse rad9 causes abnormal cellular responses to DNA damage, genomic instability, and embryonic lethality. <u>Mol Cell</u> <u>Biol</u>, v.24, n.16, Aug, p.7235-48. 2004.

Iovannisci, D. M., D. Goebel, *et al.* Genetic analysis of adenine metabolism in Leishmania donovani promastigotes. Evidence for diploidy at the adenine phosphoribosyltransferase locus. <u>J Biol Chem</u>, v.259, n.23, Dec 10, p.14617-23. 1984.

Iovannisci, D. M., C. P. Plested, *et al.* Evidence for rosettes as an unrecognized stage in the life cycle of Leishmania parasites. <u>J Eukaryot Microbiol</u>, v.57, n.5, Sep-Oct, p.405-14. 2010.

Ivens, A. C., C. S. Peacock, *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. <u>Science</u>, v.309, n.5733, Jul 15, p.436-42. 2005.

Jackson, S. P. e J. Bartek. The DNA-damage response in human biology and disease. <u>Nature</u>, v.461, n.7267, Oct 22, p.1071-8. 2009.

Jenni, L., S. Marti, et al. Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. <u>Nature</u>, v.322, n.6075, Jul 10-16, p.173-5. 1986.

Kapler, G. M., C. M. Coburn, *et al.* Stable transfection of the human parasite Leishmania major delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. <u>Mol Cell Biol</u>, v.10, n.3, Mar, p.1084-94. 1990.

Kondo, T., K. Matsumoto, *et al.* Role of a complex containing Rad17, Mec3, and Ddc1 in the yeast DNA damage checkpoint pathway. <u>Mol Cell Biol</u>, v.19, n.2, Feb, p.1136-43. 1999.

Kshirsagar, N., R. Ferner, *et al.* Pharmacovigilance methods in public health programmes: the example of miltefosine and visceral leishmaniasis. <u>Trans R Soc</u> <u>Trop Med Hyg</u>, v.105, n.2, Feb, p.61-7.

Laban, A., J. F. Tobin, *et al.* Stable expression of the bacterial neor gene in Leishmania enriettii. <u>Nature</u>, v.343, n.6258, Feb 8, p.572-4. 1990.

Lainson, R. e J. J. Shaw. Observations on the development of Leishmania (L.) chagasi Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector Lutzomyia longipalpis (Lutz and Neiva). <u>Ann Parasitol Hum Comp</u>, v.63, n.2, p.134-45. 1988.

Lebowitz, J. H., H. Q. Smith, et al. Coupling of poly(A) site selection and transsplicing in Leishmania. <u>Genes Dev</u>, v.7, n.6, Jun, p.996-1007. 1993.

Lee, J. H. e T. T. Paull. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. <u>Oncogene</u>, v.26, n.56, Dec 10, p.7741-8. 2007.

Lee, S. E., J. K. Moore, *et al.* Saccharomyces Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. <u>Cell</u>, v.94, n.3, Aug 7, p.399-409. 1998.

Legare, D., D. Richard, et al. The Leishmania ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. J Biol Chem, v.276, n.28, Jul 13, p.26301-7. 2001.

Lengauer, C., K. W. Kinzler, et al. Genetic instabilities in human cancers. <u>Nature</u>, v.396, n.6712, Dec 17, p.643-9. 1998.

Leprohon, P., D. Legare, *et al.* Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant Leishmania infantum. <u>Nucleic Acids Res</u>, v.37, n.5, Apr, p.1387-99. 2009.

Lighthall, G. K. e S. H. Giannini. The chromosomes of Leishmania. <u>Parasitol Today</u>, v.8, n.6, Jun, p.192-9. 1992.

Lindahl, T. e B. Nyberg. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. <u>Biochemistry</u>, v.11, n.19, Sep 12, p.3610-8. 1972.

Lye, L. F., K. Owens, *et al.* Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. <u>PLoS Pathog</u>, v.6, n.10, p.e1001161.

Mair, G., H. Shi, et al. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. <u>Rna</u>, v.6, n.2, Feb, p.163-9. 2000.

Majka, J. e P. M. Burgers. The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. <u>Prog Nucleic Acid Res Mol Biol</u>, v.78, p.227-60. 2004.

Marchini, J. F., A. K. Cruz, *et al.* The H region HTBF gene mediates terbinafine resistance in Leishmania major. <u>Mol Biochem Parasitol</u>, v.131, n.1, Sep, p.77-81. 2003.

Mcconville, M. J., D. De Souza, *et al.* Living in a phagolysosome; metabolism of Leishmania amastigotes. <u>Trends Parasitol</u>, v.23, n.8, Aug, p.368-75. 2007.

Mckean, P. G., J. K. Keen, *et al.* Identification and characterisation of a RAD51 gene from Leishmania major. <u>Mol Biochem Parasitol</u>, v.115, n.2, Jul, p.209-16. 2001.

Medhurst, A. L., D. O. Warmerdam, *et al.* ATR and Rad17 collaborate in modulating Rad9 localisation at sites of DNA damage. <u>J Cell Sci</u>, v.121, n.Pt 23, Dec 1, p.3933-40. 2008.

Medina-Acosta, E. e G. A. Cross. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. <u>Mol Biochem Parasitol</u>, v.59, n.2, Jun, p.327-9. 1993.

Misra, S., M. Hall, 3rd, *et al.* Molecular characterization of a human BRCA2 homolog in Leishmania donovani. J Parasitol, v.91, n.6, Dec, p.1492-5. 2005.

Neves, D. P. Parasitologia Humana. Belo Horizonte: Atheneu. 2001

Niida, H. e M. Nakanishi. DNA damage checkpoints in mammals. <u>Mutagenesis</u>, v.21, n.1, Jan, p.3-9. 2006.

Nunes, V. S., J. D. Damasceno, *et al.* The Hus1 homologue of Leishmania major encodes a nuclear protein that participates in DNA damage response. <u>Mol Biochem</u> <u>Parasitol</u>, v.177, n.1, May, p.65-9.

Ohnishi, T., E. Mori, *et al.* DNA double-strand breaks: their production, recognition, and repair in eukaryotes. <u>Mutat Res</u>, v.669, n.1-2, Oct 2, p.8-12. 2009.

Ouellette, M., J. Drummelsmith, et al. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. <u>Drug Resist Updat</u>, v.7, n.4-5, Aug-Oct, p.257-66. 2004.

Padilla-Mejia, N. E., L. E. Florencio-Martinez, *et al.* Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites. <u>BMC Genomics</u>, v.10, p.232. 2009.

Paparatto, D., D. Fletcher, *et al.* The Schizosaccharomyces pombe checkpoint kinases Chk1 and Cds1 are important for cell survival in response to cisplatin. <u>PLoS</u> <u>One</u>, v.4, n.7, p.e6181. 2009.

Parrilla-Castellar, E. R., S. J. Arlander, *et al.* Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. <u>DNA Repair (Amst)</u>, v.3, n.8-9, Aug-Sep, p.1009-14. 2004.

Passos-Silva, D. G., M. A. Rajao, *et al.* Overview of DNA Repair in Trypanosoma cruzi, Trypanosoma brucei, and Leishmania major. <u>J Nucleic Acids</u>, v.2010, p.840768.

Ramachandran, C. e S. J. Melnick. Multidrug resistance in human tumors--molecular diagnosis and clinical significance. <u>Mol Diagn</u>, v.4, n.2, Jun, p.81-94. 1999.

Rittig, M. G. e C. Bogdan. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. <u>Parasitol Today</u>, v.16, n.7, Jul, p.292-7. 2000.

Roberts, L. S. e J. Janovy. Foundations of Parasitology. Boston: McGraw-Hill. 2000

Robertson, A. B., A. Klungland, *et al.* DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. <u>Cell Mol Life Sci</u>, v.66, n.6, Mar, p.981-93. 2009.

Sacks, D. e S. Kamhawi. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. <u>Annu Rev Microbiol</u>, v.55, p.453-83. 2001.

Sacks, D. L. e R. P. Da Silva. The generation of infective stage Leishmania major promastigotes is associated with the cell-surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. <u>J Immunol</u>, v.139, n.9, Nov 1, p.3099-106. 1987.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. <u>Science</u>, v.239, n.4839, Jan 29, p.487-91. 1988.

Sancar, A., L. A. Lindsey-Boltz, *et al.* Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. <u>Annu Rev Biochem</u>, v.73, p.39-85. 2004.

Sanchez, Y., J. Bachant, *et al.* Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. <u>Science</u>, v.286, n.5442, Nov 5, p.1166-71. 1999.

Singh, S. B., R. Tandon, *et al.* Rab5-mediated endosome-endosome fusion regulates hemoglobin endocytosis in Leishmania donovani. <u>EMBO J</u>, v.22, n.21, Nov 3, p.5712-22. 2003.

Sohn, S. Y. e Y. Cho. Crystal structure of the human rad9-hus1-rad1 clamp. J Mol Biol, v.390, n.3, Jul 17, p.490-502. 2009.

Sun, Z., J. Hsiao, *et al.* Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint. <u>Science</u>, v.281, n.5374, Jul 10, p.272-4. 1998.

Sundar, S., T. K. Jha, *et al.* Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. <u>N Engl J</u> <u>Med</u>, v.347, n.22, Nov 28, p.1739-46. 2002.

Thomas, S., A. Green, *et al.* Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in Leishmania major. <u>BMC Genomics</u>, v.10, p.152. 2009.

Van Der Ploeg, L. H. Discontinuous transcription and splicing in trypanosomes. <u>Cell</u>, v.47, n.4, Nov 21, p.479-80. 1986.

Vialard, J. E., C. S. Gilbert, *et al.* The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec1/Tel1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage. <u>Embo J</u>, v.17, n.19, Oct 1, p.5679-88. 1998.

Vidal, A. E., M. Harkiolaki, *et al.* Crystal structure and DNA repair activities of the AP endonuclease from Leishmania major. <u>J Mol Biol</u>, v.373, n.4, Nov 2, p.827-38. 2007.

Weiss, R. S., T. Enoch, *et al.* Inactivation of mouse Hus1 results in genomic instability and impaired responses to genotoxic stress. <u>Genes Dev</u>, v.14, n.15, Aug 1, p.1886-98. 2000.

Weiss, R. S., S. Matsuoka, *et al.* Hus1 acts upstream of chk1 in a mammalian DNA damage response pathway. <u>Curr Biol</u>, v.12, n.1, Jan 8, p.73-7. 2002.

Who. Weekly Epidemiological Report. p.365-372 2002

Wu, X., S. M. Shell, *et al.* Interaction and colocalization of Rad9/Rad1/Hus1 checkpoint complex with replication protein A in human cells. <u>Oncogene</u>, v.24, n.29, Jul 7, p.4728-35. 2005.

Zegerman, P. e J. F. Diffley. DNA replication as a target of the DNA damage checkpoint. <u>DNA Repair (Amst)</u>, v.8, n.9, Sep 2, p.1077-88. 2009.

Zhao, H. e H. Piwnica-Worms. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. <u>Mol Cell Biol</u>, v.21, n.13, Jul, p.4129-39. 2001.

Zhou, B. B. e S. J. Elledge. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. <u>Nature</u>, v.408, n.6811, Nov 23, p.433-9. 2000.

Zou, L., D. Liu, *et al.* Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u>, v.100, n.24, Nov 25, p.13827-32. 2003.

**PUBLICAÇÃO** 



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<sup>a,1</sup>, Jeziel D. Damasceno<sup>a,1</sup>, Raimundo Freire<sup>b</sup>, Luiz R.O. Tosi<sup>a,\*</sup>

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

<sup>b</sup> Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Canarias, Ofra s/n, La Cuesta, 38320 Tenerife, Spain

#### ARTICLE INFO

Article history: Received 31 August 2010 Received in revised form 11 January 2011 Accepted 20 January 2011 Available online 1 February 2011

Keywords: Hus1 Leishmania DNA damage repair Genome maintenance Rad9/Rad1/Hus1

#### ABSTRACT

The protozoan parasite *Leishmania* presents a dynamic and plastic genome in which gene amplification and chromosome translocations are common phenomena. Such plasticity hints at the necessity of dependable genome maintenance pathways. Eukaryotic cells have evolved checkpoint control systems that recognize altered DNA structures and halt cell cycle progression allowing DNA repair to take place. In these cells, the PCNA-related heterotrimeric complex formed by the proteins Hus1, Rad9, and Rad1 is known to participate in the early steps of replicative stress sensing and signaling. Here we show that the Hus1 homolog of *Leishmania major* is a nuclear protein that improves the cell capability to cope with replicative stress. Overexpression of LmHus1 confers resistance to the genotoxic drugs hydroxyurea (HU) and methyl methanesulfonate (MMS) and resistance to HU correlates to reduced net DNA damage upon LmHus1 expression.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Gene amplification and chromosome polymorphisms are typical features of Leishmania genome structure and denote a robust ability to deal with such highly dynamic genome [1-3]. Genome stability is constantly challenged by DNA damage that is caused either by the metabolism of the cell or by exogenous factors. Specific pathways have evolved to recognize, manage and repair the injuries inflicted on the DNA molecule, namely the DNA damage response, which in eukaryotes includes mechanisms that delay cell cycle (DNA damage checkpoint) and allow the repair of the lesion [4,5]. Several types of DNA damage result in the formation of regions of single stranded DNA (ssDNA) which is recognized by the single strand binding protein RPA [6,7]. One of the first players recruited to sites of RPA-coated ssDNA is a PCNA-related heterotrimeric complex formed by the proteins Hus1, Rad9, and Rad1 (9-1-1 complex) [8,9]. Once loaded onto the chromatin, the 9–1–1 complex acts as a docking site for several enzymes involved in DNA damage signaling and repair [10,11]. The relevance of the 9-1-1 complex in DNA damage sensing is underscored by the fact that the inactivation of any of its three subunits, or those of its loader, abrogates the DNA damage checkpoint in yeast and mammal models [12,13]. Recently, the structure of the human and the yeast 9-1-1 complex has been elucidated and uncovered important features of 9-1-1 functioning [14,15].

Despite its importance in eukaryote genome maintenance, the 9-1-1 complex has not been studied in trypanosomatids and only few studies have examined the existence and functioning of DNA damage sensing, signaling and repair machineries in Leishmania spp. [16-18]. We identified within the genome of Leishmania major a conserved hypothetical protein encoded by the ORF LmjF23.0290. The predicted aminoacid sequence of this ORF showed identities of 11.7% and 12.7% with the Hus1 protein of Homo sapiens and Schizosaccharomyces pombe, respectively (Fig. 1A). We also analyzed the predicted secondary structure of LmHus1 using NetSurfP online software and compared it to the structure of the human and the fission yeast Hus1. As shown in Fig. 1A, despite the relative low sequence identity observed, the predicted LmHus1 secondary structure revealed the conservation of putative  $\beta$ -sheets and  $\alpha$ helices, resembling the PCNA-like domains found in the proteins of the 9–1–1 complex of other eukaryotes [14,15]. This fact suggests a possible conservation of domains that may enable this protein to participate in DNA metabolism.

To characterize LmHus1 and its function, the gene was first PCR amplified and cloned into pXG1 vector that was then used to generate a cell line in which LmHus1 was stably transfected and maintained as an episome under selective pressure. We also raised specific mouse and rabbit  $\alpha$ -LmHus1 antibodies (Fig. 1B). As revealed by western blotting analysis of whole cell extracts, the  $\alpha$ -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

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel.: +55 16 36023117; fax: +55 16 36331786. *E-mail address*: luiztosi@fmrp.usp.br (L.R.O. Tosi).

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> These authors are equal contributors and are randomly listed.

<sup>0166-6851/\$ -</sup> see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved. doi:10.1016/j.molbiopara.2011.01.011



Fig. 1. LmHus1 localizes to the nucleus. (A) Hus1 predicted amino acid sequences from L. major (Genbank accession number: XP\_001683353.1), H. sapiens (NP\_004498.1) and S. pombe (NP\_594739.1) were subjected to ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) alignments. Subsequent manual adjustments were performed using BioEdit software (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html). Conservation and conservative substitutions were highlighted by BOXSHADE software (http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py). Secondary structure prediction was carried out using NetSurfP [26]. Predicted  $\beta$ -sheets and  $\alpha$ -helices for the LmHus1 sequence is depicted on the upper part of the alignment. For comparison purpose the  $\beta$ -sheets and  $\alpha$ -helices described for the human and yeast Hus1 protein [27] are depicted on the lower part of the alignment. (B) LmHus1 coding sequence of L. major LT252 (MHOM/IR/1983/IR) was amplified from genomic DNA using primers LT105 (5'TtgtacaGTATGCGCTTCAAGGCGACC3') and LT106 (5'CagatctCCGCTACGCCCTTGCGGGGA3'); cloned into pGEM®-T Easy vector (Promega) and subcloned into vector pXG1 [28]. The pXG1-LmHus1 construct was transfected into the parasite to generate the LmHus1 cell line. Promastigote forms of WT L. major were cultivated and transfected as previously described [29]; LmHus1 transfectant was selected on 16  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> of geneticin (G418, Invitrogen). For immunoprecipitation (IP) 2 × 10<sup>9</sup> cells were lyzed by sonication in 20 mM Tris-Cl pH 7.6 containing 1× protease inhibitor cocktail (Sigma); Extracts were pre-cleared with protein A-agarose beads (Roche) for 1 h and further incubated with mouse α-LmHus1 serum plus protein A-agarose beads for 16 h at 4°C; beads were collected and washed 3× in PBS containing 300 mM NaCl, 0.1% Triton X100. Cell extracts used for IP (INPUT) and IP products were analyzed by western blotting (WB) with a rabbit  $\alpha$ -LmHus1 serum. The same membrane was reprobed with  $\alpha$ -GAPDH antibody as a loading control of the samples. (C) LmHus1 cells were harvested, washed in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min. Fixed cells were adhered to biobond treated glass coverslips and permeabilized with 0.3% Triton X-100 for 30 min. Affinity purified α-LmHus1 rabbit antibody was used at 1:50 dilution and protein was visualized with Alexa Fluor 594 conjugated secondary antibody (Invitrogen). Cells were mounted with ProLong® Gold Antifade Reagent containing 4',6-diamidino-2phenylindole (DAPI) which labels the nucleus (n) and kinetoplast (k). Individual images were acquired with a Leica DMI 4000B inverted microscope with a Leica DFC340 Fx camera and Merge images were obtained using PhotoShop 7.0 software. Mouse α-LmHus1 polyclonal serum was raised against full length LmHus1 as a GST fusion protein; rabbit α-LmHus1 polyclonal serum was raised against full length LmHus1 as a 6XHis fusion protein.

the  $\alpha$ -LmHus1 mouse polyclonal serum (Fig. 1B). Then, LmHus1 subcellular localization was investigated by immunofluorescence. As shown in Fig. 1C, LmHus1 protein was exclusively localized to the cell nucleus. LmHus1 was also expressed in the parasite as a C-terminal fusion to the Green Fluorescence Protein (GFP) and also localized to the cell nucleus (Fig. S1; Supplementary information). These results are consistent with the established subcellular local-

ization of this protein of other organisms such as yeast or the fruit fly *Drosophila melanogaster* [19,20].

To further examine the involvement of LmHus1 in the DNA damage response, we investigated the effect of its overexpression on the parasite growth in the presence of genotoxic drugs hydroxyurea (HU) and methyl methanesulfonate (MMS), which impair replication and halts the replication fork. HU inhibits ribonucleotide

#### Table 1

Resistance of different L. major cell lines to genotoxic drugs.

Cell line	EC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (fold resistance) <sup>b</sup>					
	HU (µgmL <sup>-1</sup> )		MMS (mM)		Phleomycin ( $\mu g m L^{-1}$ )	
Wild type	$9.4\pm0.4$	(1.0)	$0.35\pm0.09$	(1.0)	$0.42\pm0.05$	(1.0)
LmHus1	$22.4\pm0.6^{*}$	(2.4)	$0.70 \pm 0.2^{**}$	(2.0)	$0.46\pm0.03$	(1.1)
No Episome	$13.0 \pm 1.0$	(1.4)	$0.45 \pm 0.3$	(1.3)	$0.45\pm0.03$	(1.1)
Empty vector	$13.0\pm1.1$	(1.2)	$0.26\pm0.2$	(0.7)	$0.43\pm0.01$	(1.0)

(\*), (\*\*) Values are significantly different from the wild type by Student's *t*-test and are marked with asterisks. \**P*>0.001; \*\**P*>0.02.

<sup>a</sup> The drug EC<sub>50</sub> is the concentration that decreases the rate of cell growth by 50%.

<sup>b</sup> The fold resistance is the ratio of the drug  $EC_{50}$ s for experimental and wild type cells measured in the same experiment.



**Fig. 2.** LmHus1 overexpression mediates improved recovery from DNA damage. (A) WT ( $\bigcirc$ ) and the LmHus1 cell line ( $\bullet$ ) mid-log cells were treated for 48 h with 10 mM HU. Cells were washed and seeded in fresh medium to 10<sup>5</sup> cells mL<sup>-1</sup>; parasite growth was monitored daily; a transfectant carrying an empty pXG1 vector ( $\triangle$ ) was used as control. (B) DNA damage was investigated in HU-treated cells using in situ labeling of 3'-OH ends on DNA; untreated or 10 mM HU-treated mid-log phase WT and LmHus1 cell lines were fixed for 20 min with 2% paraformaldehyde in PBS, permeabilized for 20 min with 0.2% Triton X100 in PBS and washed with PBS. 3'-OH DNA ends were labeled by enzymatic addition of fluorescein-12-UTP (Promega) by Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) (Promega). A total of 50,000 cells from each condition were analyzed in a FACSort BD (Becton Dickinson) using the FLH-1 detector and the Cell Quest Pro software, histograms were analyzed using FlowJo version 7.5.5; the gate used was based on the background fluorescence of untreated WT cells. Upper left and right panels are LmHus1 cell line and WT cells treated with HU, respectively. Lower left panel shows untreated WT cells and lower right panel shows WT subjected to DNase treatment prior to labeling.

reductase that catalyses the formation of deoxyribonucleotides and MMS causes base misparing and replication blockage by methylation of N<sup>7</sup>-deoxyguanine and N<sup>3</sup>-deoxyadenine on DNA. As shown in Table 1 and Fig. S2, the cell line that overexpressed LmHus1 was 2.4 times more resistant to HU when compared to WT cells. A parasite transfectant bearing an empty pXG1 vector was used as a control cell line in these experiments and was not significantly different from WT cells. A cell line that lost the pXG1-LmHus1 episome after continuous passages without selective pressure did not present significant resistance to the tested drugs further confirming the participation of LmHus1 in the observed phenotype. As also shown in Table 1 and Fig. S2, the pattern of MMS resistance was comparable to that observed for HU. As expected, the LmHus1 cell line did not show any significant resistance to phleomycin, which generates double strand breaks and is sensed, managed and repaired by a different branch of the DNA damage response involving the proteins ATM and Chk2 in other eukaryotes [21].

To rule out the effect of the overexpression of a nuclear protein in the observed phenotypes, we analyzed the resistance profile of a cell line which overexpressed a GFPLmHus1 fusion within the parasite nucleus. As presented in Fig. S1, despite the overexpression of the nuclear fusion, the GFPLmHus1 cell line was not resistant to HU. Abrogation of the resistance phenotype in this cell line was possibly due to conformational changes caused by the GFP tagging. This data suggested that the resistance observed in the LmHus1 cell line is a direct effect of LmHus1 expression.

Leishmania evasion from drug action can be achieved by a variety of biochemical mechanisms, which include inhibition of drug uptake and/or its activation. The participation of unrelated drug resistance mechanisms in the phenotypes observed was ruled out by the observed reversion in HU resistance observed upon LmHus1 episome loss (Table 1 and Fig. S2). Therefore, we next investigated whether the LmHus1 cell line HU resistance was due to an improved recovery from DNA replicative stress. In these experiments we analyzed the growth of cells in drug-free medium after being treated with HU. As observed in Fig. 2A, LmHus1 cell line promptly recovered and entered exponential growth after HU treatment. On the other hand, WT cells presented a 3-days delay in recovering from DNA damage caused by HU exposure. Considering that the growth profile of LmHus1 cell line and WT cells are identical in standard culture conditions (Fig. S3), this data indicates that LmHus1 overexpression improved the cell capability to cope with replicative stress

We also asked whether the ability of LmHus1 cell line to recover from DNA damage was due to improved DNA repair. Therefore, we investigated the amount of DNA damage by labeling free 3'-OH ends on DNA of permeabilized WT and LmHus1 cells. In these experiments, 3'-OH ends resulting from HU treatment were labeled with fluorescein-UTP using the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzyme. As presented in Fig. 2B, FACS analysis revealed that 40.8% of the LmHus1 cells exposed to HU (LmHus1 + HU; upper left panel) were comparable to control WT cell lines that had not been exposed to HU (WT; lower left panel). On the other hand, up to 90% of WT cells exposed to HU (WT + HU; upper right panel) presented levels of 3'-OH ends comparable to cells that had been treated with DNase (WT+DNAse, lower right panel). These results suggested that the improved recovery of LmHus1 cell line from HU treatment was due to a reduced amount of DNA damage. Altogether these data demonstrate that overexpression of LmHus1 leads to an enhanced DNA damage repair activity indicating that LmHus1 is involved in Leishmania genome maintenance.

The role of LmHus1 in the *Leishmania* response to these genotoxic drugs is compatible with a scenario in which resistance is mediated through the activation of the ATR kinase-dependent checkpoint response [22,23]. In mammalian cells, the binding of 9–1–1 complex to ssDNA stretches specially blocks the replication fork and facilitates the activation of the ATR pathway via interaction with the TopBP1 protein [24]. Then, ATR phosphorylates both the effector kinase Chk1 and Rad17, a subunit of the 9–1–1 clamp loader. Rad17 phosphorylation stabilizes 9–1–1 binding to the chromatin and strengthens the ATR-dependent checkpoint signaling [25].

One possible limitation of our study is the use of a cell line in which LmHus1 is overexpressed. Considering that the proper assembly of the trimeric 9–1–1 complex might be dependent on the cellular levels of each of its components, the imbalance caused by excess of LmHus1 could interfere with 9–1–1 complex normal function. Future studies should include the testing of an LmHus1 null mutant, which could contribute to our knowledge on the dynamics of the complex formation and function. Therefore, a relevant subject that remains to be investigated is the existence of Hus1 partners and the formation of the 9-1-1 complex in this organism. If so, it will be important to explore the mechanisms underlying 9-1-1 function in this ancient eukaryote. In this sense, a cell line in which LmHus1 had been disrupted or deleted will be a tool of great value for functional studies.

Here we provided data suggesting that LmHus1 expression improves the parasite capability to cope with replicative stress. Overall, our data suggest that LmHus1 plays a role in DNA repair mechanisms in the protozoan parasite *Leishmania*.

#### Author contributions

LROT, JDD and VSN designed the research and wrote the manuscript. LROT supervised and monitored the data collection. JDD performed sequence analysis and immunolocalization experiments; produced recombinant LmHus1 and generated mouse polyclonal  $\alpha$ -LmHus1 serum; performed IP and western blotting analysis. VSN generated the LmHus1 and GFPLmHus1 cell lines; did the drug resistance tests and in situ analysis of DNA damage; performed the subcellular localization of GFPLmHus1. RF produced recombinant LmHus1; generated rabbit polyclonal  $\alpha$ -LmHus1 serum and critically revised the manuscript.

#### Acknowledgements

We are grateful to Dr Paul Michels for providing the  $\alpha$ -GAPDH antibodies, to Marlei J. Augusto, Walter M. Turato and Tania Defina for technical assistance, to Lucas A. Araujo for assistance with 3'-OH labeling assays and to Dr. Liliana M. Massis for assistance with mouse polyclonal antibody production. This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (07/56187-0; 06/50323-7 07/55728-8 and 07/54504-9) and CNPq.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.molbiopara.2011.01.011.

#### References

- Beverley SM. Gene amplification in Leishmania. Annu Rev Microbiol 1991;45:417–44.
- [2] Grondin K, Roy G, Ouellette M. Formation of extrachromosomal circular amplicons with direct or inverted duplications in drug-resistant *Leishmania tarentolae*. Mol Cell Biol 1996;16(7):3587–95.
- [3] Squina FM, Pedrosa AL, Nunes VS, Cruz AK, Tosi LRO. Shuttle mutagenesis and targeted disruption of a telomere-located essential gene of *Leishmania*. Parasitology 2007;134(Pt 4):511–22.
- [4] Jeggo PA, Lobrich M. Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. DNA Repair (Amst) 2006;5(9-10):1192-8.
- [5] Lazzaro F, Giannattasio M, Puddu F, et al. Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair. DNA Repair (Amst) 2009;8(9):1055–67.
- [6] Cai L, Roginskaya M, Qu Y, Yang Z, Xu Y, Zou Y. Structural characterization of human RPA sequential binding to single-stranded DNA using ssDNA as a molecular ruler. Biochemistry 2007;46(28):8226–33.
- [7] Zou L, Elledge SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. Science 2003;300(5625):1542–8.
- [8] Wu X, Shell SM, Zou Y. Interaction and colocalization of Rad9/Rad1/Hus1 checkpoint complex with replication protein A in human cells. Oncogene 2005;24(29):4728–35.
- [9] Zou L, Liu D, Elledge SJ. Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100(24):13827–32.
- [10] Bermudez VP, Lindsey-Boltz LA, Cesare AJ, et al. 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 USA 2003;100(4):1633–8.
- [11] Parrilla-Castellar ER, Arlander SJ, Karnitz L. Dial 9–1–1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9–1–1) clamp complex. DNA Repair (Amst) 2004;3(8–9):1009–14.
- [12] Bao S, Lu T, Wang X, et al. Disruption of the Rad9/Rad1/Hus1 (9-1-1) complex leads to checkpoint signaling and replication defects. Oncogene 2004;23(33):5586-93.

- [13] Paulovich AG, Armour CD, Hartwell LH. The Saccharomyces cerevisiae RAD9, RAD17, RAD24 and MEC3 genes are required for tolerating irreparable, ultraviolet-induced DNA damage. Genetics 1998;150(1):75–93.
- [14] Dore AS, Kilkenny ML, Rzechorzek NJ, Pearl LH. Crystal structure of the rad9-rad1-hus1 DNA damage checkpoint complex—implications for clamp loading and regulation. Mol Cell 2009;34(6):735–45.
- [15] Sohn SY, Cho Y. Crystal structure of the human rad9-hus1-rad1 clamp. J Mol Biol 2009;390(3):490-502.
- [16] McKean PG, Keen JK, Smith DF, Benson FE. Identification and characterisation of a RAD51 gene from *Leishmania major*. Mol Biochem Parasitol 2001;115(2):209–16.
- [17] Misra S, Hall III M, Chaudhuri G. Molecular characterization of a human BRCA2 homolog in *Leishmania donovani*. J Parasitol 2005;91(6):1492–5.
- [18] Vida AE, HarKiolaki M, Gallego C, et al. Crystal structure and DNA repair activities of the AP endonuclease from *Leishmania major*. J Mol Biol 2007;373(4):827–38.
- [19] Caspari T, Dhalen M, Kanter-Smoler G, et al. Characterization of Schizosaccharomyces pombe Hus1: a PCNA-related protein that associates with Rad1 and Rad9. Mol Cell Biol 2000;20(4):1254–62.
- [20] Peretz G, Arie LG, Bakhrat A, Abdu U. The Drosophila hus1 gene is required for homologous recombination repair during meiosis. Mech Dev 2009;126(8–9):677–86.
- [21] Lee JH, Paull TT. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. Oncogene 2007;26(56):7741-8.

- [22] Delacroix S, Wagner JM, Kobayashi M, Yamamoto K, Karnitz LM. The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. Genes Dev 2007;21(12):1472-7.
- [23] Lee J, Kumagai A, Dunphy WG. The Rad9–Hus1–Rad1 checkpoint clamp regulates interaction of TopBP1 with ATR. J Biol Chem 2007;282(38):28036–44.
- [24] Lee J, Dunphy WG. Rad17 plays a central role in establishment of the interaction between TopBP1 and the Rad9–Hus1–Rad1 complex at stalled replication forks. Mol Biol Cell 2010;21(6):926–35.
- [25] Medhurst AL, Warmerdam DO, Akerman I, et al. ATR and Rad17 collaborate in modulating Rad9 localisation at sites of DNA damage. J Cell Sci 2008;121(Pt 23):3933–40.
- [26] Petersen B, Petersen TN, Andersen P, Nielsen M, Lundegaard C. A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. BMC Struct Biol 2009;9:p51.
- [27] Xu M, Bai L, Gong Y, Xie W, Hang H, Jiang T. Structure and functional implications of the human rad9–hus1–rad1 cell cycle checkpoint complex. J Biol Chem 2009;284(31):20457–61.
- [28] Ha DS, Schwarz JK, Beverley SM. Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected Leishmania. Mol Biochem Parasitol 1996;77(1):57–64.
- [29] Kapler GM, Coburn CM, Beverley SM. Stable transfection of the human parasite Leishmania major delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. Mol Cell Biol 1990;10(3):1084–94.



Figure S1. An overexpressed GFPLmHus1 fusion localizes to the nucleus and **does notmediate HU resistance.** LmHus1 coding sequence was amplified from *L*. major genomic DNA using primers LT105 and LT106 and cloned into pGEM®-T Easy vector. The BsrGI and Bg/II sites in primers LT105 and LT106, respectively, are indicated in lowercase in figure 1B and were used to direct in-frame cloning of LmHus1 into pXGGFP vector. The construct was transfected into the parasite as described in figure 1 to generate the GFPLmHus1 cell line. (A) The confirmation of overexpression of GFPLmHus1 was done in a western analysis of WT (1) and GFPLmHus1 cell line (2) using a rabbit  $\alpha$ -LmHus1 serum (left panel) and  $\alpha$ -GFP antibody (right panel); the on the right panel samples were previously IP from cell extracts using the  $\alpha$ -GFP antibody. (B) Log phase cells were fixed with 4% *p*-formaldehyde, washed, adhered to cover slips and mounted with ProLong® Gold antifade reagent (Invitrogen) containing DAPI. Fluorescence labeling was visualized in a Leica TCS-SP5 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) using a 100X immersion objective. Images were processed using Leica confocal software v2.1104; the nucleus (n) and kinetoplast (k) are indicated; bars represent  $5\mu$ m scale. (**C**) The relative growth of the GFPLmHus1 cell line (■) and the WT cells (O) was determined in the presence of the indicated concentrations of HU.



**Figure S2. LmHus1 confers resistance to HU and MMS.** To generate the dat246 a presented in Table 1, the LmHus1 cell line ( $\bullet$ ); the WT cells (O); a cell line originated from LmHus1 transfectant that lost the pXG1-LmHus1 epissome ( $\Box$ ) and a transfectant bearing an empty pXG1 vector ( $\Delta$ ) were seeded in fresh media at 2x105 cells. mL-1 in the presence of the indicate concentrations of HU (A); MMS (B); and phleomycin (C). Cell density was monitored and represented as relative growth.

Figure S2



**Figure S3. The growth of WT and LmHus1 cell lines are similar.** The LmHus1 cell line ( $\bullet$ ); the WT cells (O); and the pXG1 transfectant ( $\Delta$ ) were seeded in fresh media at 2,0x105 cells.mL-1 density and parasite number was monitored daily.

Figure S3