UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

RENATO ELIAS RODRIGUES DE SOUZA SANTOS

Desenvolvimento de um sistema induzível de expressão mediado pela
Cre-recombinase para a caracterização do domínio C-terminal da proteína Rad9
de *Leishmania major*

Ribeirão Preto

2017

RENATO ELIAS RODRIGUES DE SOUZA SANTOS

Desenvolvimento de um sistema induzível de expressão mediado pela
Cre-recombinase para a caracterização do domínio C-terminal da proteína Rad9
de *Leishmania major*

*Development of an inducible system for the expression of proteins mediated by Cre-
recombinase for the characterization of the C-terminal domain of Rad9 protein from
Leishmania major*

Versão original

Dissertação apresentada ao Departamento de
Biologia Celular e Molecular e Bioagentes
Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular
Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi

Ribeirão Preto

2017

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Renato Elias Rodrigues de Souza

Desenvolvimento de um sistema induzível de expressão mediado pela Cre recombinase para a caracterização do domínio C-terminal da proteína Rad9 de *Leishmania major*. Ribeirão Preto, 2017.

78 p. : il. ; tab. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Tosi, Luiz Ricardo Orsini

1. Leishmania. 2. Cre Recombinase. 3. Rad9.

Nome: SANTOS, Renato Elias Rodrigues de Souza

Título: Desenvolvimento de um sistema induzível de expressão mediado pela Cre-recombinase para a caracterização do domínio C-terminal da proteína Rad9 de *Leishmania major*

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi

Aprovado em: __ / __ / ____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi, pela oportunidade de ter trabalhado e aprendido muito sob sua supervisão nestes dois anos.

Ao Jeziel, pelas importantes contribuições que foram feitas para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais membros do Laboratório de Biologia Molecular de Leishmanias, Elaine, Ricardo, Gabriel, Stela e Matheus, pela companheirismo e contribuição para o bom andamento desta dissertação.

À Prof. Dr^a Ângela e aos integrantes de seu laboratório, pela prestatividade e auxílio fornecidos durante a execução deste trabalho.

Aos funcionários que mantêm o bom funcionamento do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes patogênicos, especialmente a Gabriela, Lúcia e Camila. E também à Bete, Roberta e todos aqueles que contribuíram nesta jornada.

À minha família, especialmente minha mãe, Adriana e meus avós, Berenice e Lauro, pelo apoio, amor e compreensão que foram essenciais. Também agradeço aos demais integrantes da minha família Rodrigo, Gisleide, Vitória, Regiane, Alexandre, e todos aqueles que sempre torceram por mim.

Também sou eternamente grato ao João, pelo convívio, suporte e divertidos momentos que passamos. Assim como sua família, pelo carinho e acolhimento.

Aos meus amigos (Lívia, Raquel, Júlia, Edson, Veronica, Lais, Ana, Dani) que por perto ou à distância sempre estiveram presentes, apoiando e torcendo pela conclusão com sucesso desta etapa.

Agradeço também à CAPES, FAPESP, e aos contribuintes, cujo apoio financeiro foi essencial para a execução deste projeto.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram nestes anos, meu grande obrigado!

Resumo

Santos, RERS. Desenvolvimento de um sistema induzível de expressão mediado pela Cre-recombinase para a caracterização do domínio C-terminal da proteína Rad9 de *Leishmania major*. 2017. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área Biologia Celular e Molecular) – Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O desenvolvimento de novas ferramentas para manipulação genética é necessário para um melhor entendimento da biologia de protozoários que causam doenças sérias e negligenciadas. Neste contexto, apresentamos uma nova aplicação do sistema Cre recombinase em *Leishmania major*, utilizado para a expressão condicional de genes de interesse. Como prova de conceito demonstramos por ensaios de PCR, western blotting e imunofluorescência que o gene da Proteína Fluorescente Verde (*Green Fluorescent Protein*, GFP) é condicionalmente expresso em função do tempo e dose de rapamicina necessários para a ativação da recombinase. A aplicação do sistema diCre em *L. major* é feita com o estudo da proteína Rad9, que participa na sinalização e resposta a danos ao DNA. A Rad9 de *L. major* possui um domínio C-terminal desestruturado, que no homólogo humano não é essencial para a formação do complexo 911 (Rad9-Hus1-Rad1), mas possui sítios de fosforilação importantes para a cascata de sinalização que mantém a integridade do DNA. Usando predições da estrutura de Rad9, a proteína foi dividida em domínios e foram geradas linhagens que expressam, condicionalmente, versões truncadas de Rad9. Por análises de PCR, western blotting, citometria de fluxo e imunofluorescência, acessamos alguns dos papéis que o domínio C-terminal de Rad9 pode desempenhar em *L. major*.

Palavras-chave: Leishmania. Cre-recombinase. Rad9

Abstract

Santos, RERS. Development of an inducible system for the expression of proteins mediated by Cre-recombinase for the characterization of the C-terminal domain of Rad9 protein from *Leishmania major*. 2017. 78 p. Dissertation – Department of Molecular and Cell Biology, Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo.

The development of new tools for genetic manipulation is necessary for a better understanding of the biology of protozoa that cause severe and neglected diseases. In this context, we present a new application of the Cre recombinase system in *Leishmania major*, using it for the conditional expression of genes of interest. As proof of concept we show by PCR, western blotting and immunofluorescence assays that the Green Fluorescent Protein (GFP) gene can be conditionally expressed depending on the time and dose of the rapamycin treatment required for the recombinase activation. The application of the diCre system in *L. major* was tested with the study of the Rad9 protein, which participates in the parasite's DNA damage response. Rad9 from *L. major* presents an unstructured C-terminal domain, which in the human homolog is not essential for the 911 (Rad9-Hus1-Rad1) complex formation, but has phosphorylation sites that are important in the signaling cascade that maintains the DNA integrity. Using structure predictions of Rad9, the protein was divided into specific domains and cell lines were generated conditionally expressing truncated versions of Rad9. By PCR, western blotting, flow cytometry and immunofluorescence assays, we assessed some of the roles that the C-terminal domain of Rad9 can perform in *L. major*.

Key words: Leishmania. Cre-recombinase. Rad9

Lista de tabelas

Tabela 1 – Análise da desestruturação da região C-terminal de Rad9 em diferentes espécies	18
Tabela 2 – Drogas de seleção e indução da diCre recombinase	25
Tabela 3 – Protocolo de PCR utilizando Taq DNA Polymerase	27
Tabela 4 – Condições de PCR utilizando Taq DNA Polymerase	27
Tabela 5 – Protocolo de PCR utilizando Phusion® High Fidelity DNA Polymerase ...	27
Tabela 6 – Condições de PCR utilizando Phusion® High Fidelity DNA Polymerase .	28

Lista de figuras e ilustrações

Figura 1 – Ciclo de vida em <i>Leishmania</i> spp.....	11
Figura 2 – Status da endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo, 2013.....	12
Figura 3 – Status da endemicidade da leishmaniose visceral no mundo, 2013	13
Figura 4 – Representação esquemática resumida da ativação das vias de ATR e ATM em resposta a danos ao DNA.....	15
Figura 5 – Estrutura cristalográfica do complexo 911 em <i>H. sapiens</i>	17
Figura 6 – Diferentes funções de Rad9.....	18
Figura 7 – Representação esquemática de diferentes estratégias moleculares para gerar nocautes em <i>Leishmania</i>	20
Figura 8 – Representação esquemática da Cas9 e mecanismos de reparo de quebras da dupla fita de DNA	21
Figura 9 – Sistema Cre/Lox de recombinação	22
Figura 10 – Princípio do sistema mediado pela diCre recombinase.....	23
Figura 11 – Representação esquemática e análise por PCR da linhagem diCreGFP ^{Lox}	36
Figura 12 – Geração do vetor pGL2332-C	37
Figura 13 – Perfil de crescimento de diferentes linhagens após tratamento com rapamicina.....	38
Figura 14 – Perfil de progressão no ciclo celular de diferentes linhagens após sincronização com HU.....	39
Figura 15 – Análise da inversão por PCR	40
Figura 16 – Expressão regulada de GFP após tratamento com rapamicina	41
Figura 17 – IF após indução de diCreGFP ^{Lox} com 0, 2 e 100nM RAP	42
Figura 18 – Modelamento tridimensional predito para Rad9 de <i>L. major</i> utilizando o programa Phyre ²	44
Figura 19 – Comparação das estruturas tridimensionais de HsRad9 e Rad9 de <i>L. major</i>	45
Figura 20 – Predição de estruturas desordenadas nos diferentes homólogos de Rad9.....	46
Figura 21 – Predição dos sítios de fosforilação em HsRad9 e LmRad9.....	47
Figura 22 – Divisão de Rad9 de <i>L. major</i> em domínios A, B e C	48
Figura 23 – Amplificação e digestão de Rad9AB e Rad9ABC e digestão do vetor pGL2332-C.....	49
Figura 24 – Análise da integração de diCre recombinase e fragmentos contendo Rad9ABC ^{Lox} e Rad9AB ^{Lox}	50

Figura 25 – Avaliação da inversão de Rad9ABC e Rad9AB por PCR	51
Figura 26 – Comparação do nível de expressão de Rad9ABC e Rad9AB.....	52
Figura 27 – Perfil de crescimento de Rad9ABC e Rad9AB após indução.....	52
Figura 28 – Perfil de distribuição de Rad9ABC e Rad9AB	54
Figura 29 – Formas mais frequentes da distribuição de tubulina encontradas ao longo do ciclo celular	55
Figura 30 – Porcentagem de células mitóticas e pós-mitóticas em linhagens induzidas ou não	56
Figura 31 – Perfil de progressão no ciclo celular em células induzidas ou não, após sincronização com HU 5mM.....	57

Sumário

1. Introdução	11
1.1 Aspectos gerais do protozoário e sua biologia.....	11
1.2 Metabolismo do DNA em Leishmania: como o parasito lida com o dano	14
1.3 O complexo 911 e peculiaridades da proteína LmRad9	16
1.4 Ferramentas de manipulação genética em Leishmania	19
1.4.1. O sistema diCre recombinase.....	21
2. Objetivos	24
3. Materiais e métodos	25
3.1. Cepa de <i>L. major</i> utilizada, cultivo e protocolo transfecção	25
3.2. Densidade de parasitos e curvas de crescimento	26
3.3. Análises de bioinformática	26
3.4. Extração de DNA genômico e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	26
3.5. Eletroforese em gel de agarose	28
3.6. Clonagens.....	28
3.6.1. Digestão com enzimas de restrição e purificação.....	29
3.6.2. Reações de ligação	29
3.6.3. Células eletrocompetentes e eletroporação.....	30
3.6.4. Extração de plasmídeos	30
3.6.5. Reações de sequenciamento	30
3.7. Análise de proteínas	31
3.7.1. Extrato total de proteínas.....	31
3.7.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE.....	31
3.7.3. Western blotting (WB).....	32
3.8. Imunofluorescência (IF).....	32
3.9. Citometria de Fluxo	33
4. Resultados	35
4.1. Estabelecimento da linhagem diCreGFP ^{Lox} em <i>L. major</i>	35
4.1.1. Desenvolvimento de um vetor para clonagem de genes de interesse com epítipo HA C-terminal	36
4.1.2. Tratamento com rapamicina: análise do perfil de crescimento e da progressão no ciclo celular	37
4.1.3. Prova de conceito: expressão regulada de GFP após indução com rapamicina	40

4.2. Aplicação do sistema diCre em Leishmania: estudo da região C-terminal da proteína Rad9	43
4.2.1. Análises de bioinformática	43
4.2.2. Versões truncadas de Rad9 e clonagem no vetor de expressão	48
4.2.3. Estabelecimento da linhagem diCreRad9ABC ^{Lox} e diCreRad9AB ^{Lox}	50
4.2.4. Expressão regulada de Rad9 truncada após indução com rapamicina e perfil de crescimento	51
4.2.5. Análise da localização de Rad9 por imunofluorescência	53
4.2.6. Análise da distribuição de β -tubulina após indução de Rad9	54
4.2.7. Efeitos da expressão de Rad9 na progressão do ciclo celular	56
5. Discussão	58
6. Conclusões	63
7. Bibliografia	64
8. Apêndices	69
I – Dispensa de parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)	69
II – Informações dos oligonucleotídeos utilizados no estudo	70
III – Protocolos de WB para cada anticorpo utilizado no estudo	71
IV – Mapa do vetor pGL2332, contendo GFP ^{Lox}	72
V – Vetores utilizados para geração de pGL2332-C	73
VI – Representação gráfica em escala logarítmica das curvas de crescimento apresentadas no trabalho	76
VII – Representação esquemática da clonagem de Rad9ABC e Rad9AB no vetor pGL2332-C	77
VIII – Perfil de crescimento de diCreRad9ABC ^{Lox} e diCreRad9AB ^{Lox} após sub-cultivos	78

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais do protozoário e sua biologia

As Leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas pela picada de um inseto flebotomíneo. Os parasitos são dimórficos, apresentando as formas amastigota intracelular e promastigota, flagelada extracelular. O ciclo de vida é heteroxênico com as formas transitando entre um hospedeiro vertebrado e um invertebrado (Figura 1).

Figura 1 – Ciclo de vida em *Leishmania* spp.

Mosquitos flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* liberam os parasitos na forma infectiva (promastigotas metacíclicos) para o hospedeiro vertebrado durante a picada (1); os parasitos invadem macrófagos e granulócitos (2 e 3) e se desenvolvem na forma amastigota dentro do fagolisossomo (4); nele, eles se multiplicam (5) e depois podem ser ingeridos por outros insetos que picarem o hospedeiro infectado (6); no intestino dos insetos as formas amastigotas contidas nos macrófagos ingeridos são liberadas (7) onde se transformam na forma promastigota procíclica e se dividem. Depois os parasitos migram para a válvula estomodal e se transformam em diferentes subtipos de formas promastigotas, até a forma promastigota metacíclica infectiva (8) que pode então chegar a outros hospedeiros vertebrados durante a picada destes mosquitos (9). (CANTACESSI et al., 2015)

Clinicamente, a doença se apresenta nas seguintes formas: i) leishmaniose cutânea, a forma mais comum, caracterizada por lesões na pele que se desenvolvem de semanas a meses após a picada do inseto transmissor; ii) leishmaniose visceral, a forma mais grave e fatal em 95% dos casos não tratados, que tipicamente se desenvolve meses após a picada do inseto e acomete fígado, baço e medula óssea. Existe também a terceira forma, iii) mucocutânea, que é menos comum, e pode ser prevenida ao se tratar adequadamente a forma cutânea (WHO | Leishmaniasis, 2016).

Segundo levantamento realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que a leishmaniose visceral acometa em média 300 mil pessoas anualmente; mais de 1 milhão de casos de leishmaniose cutânea foram reportados nos últimos 5 anos e existam mais de 1 bilhão de pessoas vivendo em áreas endêmicas com risco de infecção. Além disso, dados divulgados pela mesma organização em 2013 sobre a leishmaniose cutânea (Figura 2) e leishmaniose visceral (Figura 3) mostram a ampla distribuição da enfermidade pelo mundo.

Figura 2 – Status da endemidade da leishmaniose cutânea no mundo, 2013

Referência: (“WHO | Leishmaniasis”, 2016)

Figura 3 – Status da endemidade da leishmaniose visceral no mundo, 2013

Referência: (“WHO | Leishmaniasis”, 2016)

As formas para tratamento das leishmanioses são escassas, geram efeitos colaterais e resistência aos medicamentos são relatados frequentemente (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Por atingir na maior parte populações carentes que não possuem condições de arcar com tratamentos custosos, existem poucos incentivos para que a indústria farmacêutica desenvolva novos alvos terapêuticos, demonstrando assim, o caráter negligenciado deste grupo de doenças. Desta forma, as leishmanioses acabam por ter alta incidência e mortalidade em diferentes regiões do mundo, fazendo-se essencial que neste cenário estudos sejam realizados visando uma melhor compreensão da biologia deste protozoário, propiciando rotas para geração de novas formas de tratamento, medicamentos, vacinas e possivelmente a cura deste complexo grupo de doenças.

O genoma de *Leishmania* tem em média 32 Mb e cerca de 8200 genes, distribuídos entre 34 a 36 cromossomos (IVENS et al., 2005). Dentre as características marcantes da expressão gênica dos tripanossomatídeos é a organização em grandes unidades policistrônicas (STILES et al., 1999) e a presença do *trans-splicing* acoplado à poliadenilação, na fase de

processamento dos RNAs mensageiros (mRNA) onde um RNA *spliced leader* é adicionado à extremidade 5' de todos os RNAs e a cauda poli-A adicionada à extremidade 3' (LEBOWITZ et al., 1993). A plasticidade genômica também é um dos eventos presentes nestes protozoários, e que se encontra bastante relacionado ao desenvolvimento de resistência a fármacos. Neste fenômeno podem ocorrer duplicação ou deleção de pequenas regiões ou até mesmo de cromossomos inteiros (LAFFITTE et al., 2016).

1.2 Metabolismo do DNA em Leishmania: como o parasito lida com o dano

Frente a situações adversas do meio em que se encontra, como exposição a drogas, radiação ultravioleta ou até mesmo metabólitos reativos produzidos pela própria célula, o protozoário, assim como outros organismos, necessita de ferramentas para detecção e reparo de erros durante o processo de replicação de seu material genético, permitindo a manutenção da estabilidade necessária à sobrevivência.

Como exemplos de tais ferramentas, temos a via de recrutamento do complexo ATR-ATRIP, que atua principalmente quando há geração de fita simples de DNA, a qual é reconhecida pela proteína RPA (*Replication Factor A*), um complexo de três proteínas responsável pela sinalização inicial desta via, e que recruta complexos proteicos subsequentes, como o complexo 911 e efetores que podem parar o ciclo celular, como a proteína quinase Chk1 (GENOIS et al., 2014; PASSOS-SILVA et al., 2010) (Figura 4). Há também a via de sinalização mediada por ATM, que se associa principalmente a quebras na dupla-fita de DNA (*double-stranded DNA*, dsDNA) (Figura 4). Ainda existem os processos de reparo mediados por excisão de bases, onde a enzima DNA-glicosilase procura modificações nas bases e a enzima AP endonuclease cliva a ligação fosfodiéster, removendo e corrigindo a lesão; ou também o reparo por excisão de nucleotídeos, onde um complexo enzimático analisa o DNA à procura de distorções na dupla-hélice, em vez de uma alteração específica de bases (PASSOS-SILVA et al., 2010).

Figura 4 – Representação esquemática resumida da ativação das vias de ATR e ATM em resposta a danos ao DNA

RPA reconhece DNA de fita simples (ssDNA) gerado como resultado de dano ao DNA ou estresse replicativo. O reconhecimento leva ao recrutamento independente de ATR e Rad17 para os locais lesionados. Rad17 carrega o complexo 911 e facilita a ativação de ATR via ativação por TopBP1. Subsequentemente, ATR fosforila proteínas que vão atuar nos mais diferentes aspectos para impedir que o dano se perpetue na célula. Exemplos de proteínas efetoras que são ativadas através da fosforilação por ATR estão citadas no quadro roxo da figura. A ativação da via ATM se dá pelo complexo MRN, ao reconhecer quebras na dupla fita de DNA (dsDNA) que culmina com a geração de extremidades que serão reconhecidas também por proteínas da via mediada por ATR. Referência: (SHIOTANI; ZOU, 2009)

As diferentes proteínas participantes das vias de sinalização e reparo de danos ao DNA citadas acima podem ser agrupadas de acordo com a fase em que se encontram envolvidas durante o reparo do dano: 1) proteínas iniciadoras, como RPA que tem como função se ligar efetivamente às regiões danificadas no DNA; 2) proteínas sensoras, como Rad17, Rad1, Rad9 e Hus1, que são carregadas às regiões em que RPA se ligou previamente; 3) proteínas mediadoras, como a claspina, que recrutam mais proteínas para efetuar o reparo; 4) proteínas transdutoras, como ATR e ATM, que promovem modificações pós-traducionais em proteínas que atuam na resposta ao dano; e 5) proteínas efetoras, como Chk1 e Chk2 que fosforilam proteínas efetivamente envolvidas com o reparo, parada do ciclo celular e etc. (DAMASCENO, 2013; NAVADGI-PATIL; BURGERS, 2009a).

1.3 O complexo 911 e peculiaridades da proteína LmRad9

As proteínas Rad9, Hus1 e Rad1 formam um complexo (complexo 911) que participa na resposta ao dano do DNA (*DNA damage response*, DDR) em humanos e leveduras (PARRILLA-CASTELLAR; ARLANDER; KARNITZ, 2004b). O complexo 911 participa na sinalização de pontos de verificação nas fases intra-S e G2/M do ciclo celular além de interagir com maquinarias de reparo do DNA.

A estrutura cristalográfica do complexo formado em *H. sapiens* já foi resolvida (Figura 5) (DORÉ et al., 2009; SOHN; CHO, 2009). Assim como em outras espécies, a proteína Rad9 humana possui uma região C-terminal desestruturada a qual não é possível modelar numa estrutura tridimensional (UEDA et al., 2012). A presença da região C-terminal desordenada também foi verificada em outras espécies, como *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae* (NAVADGI-PATIL; BURGERS, 2009b).

Figura 5 – Estrutura cristalográfica do complexo 911 em *H. sapiens*

Em azul a proteína Hus1, com sua região N-terminal interagindo com a região C-terminal de Rad9, em rosa, cuja região N-terminal interage com a região C-terminal de Rad1, em verde, que possui a região N-terminal interagindo com a região C-terminal de Hus1. É importante notar que em relação a proteína Rad9, apenas os primeiros 272 dos 391 resíduos de aminoácidos estão representados nesta estrutura. Referência: SOHN; CHO, 2009

Em *Leishmania spp.* e em outros tripanossomatídeos, as bases moleculares da estrutura e função deste complexo ainda são pouco conhecidas. Damasceno et al. (2013) iniciaram a caracterização da proteína Hus1 e seu papel na DDR em *L. major*. Foi demonstrado que Hus1 é a proteína homóloga da Hus1 humana, sua localização nuclear, a interação com Rad9 (LmjF.15.0980) e seu papel na manutenção dos telômeros. Além disso, também foi mostrada sua participação na progressão do ciclo celular.

Em relação à proteína Rad9, além de descrever a presença do homólogo desta proteína em *L. major*, verificou-se que Rad9 também possui uma região desestruturada em sua extremidade C-terminal (DAMASCENO; NUNES; TOSI, 2013). Curiosamente, a região C-terminal de Rad9 é consideravelmente mais longa quando comparada às regiões C-terminais de outros eucariotos (Tabela 1). Em mamíferos e leveduras já é descrito que a região C-terminal contém sítios de fosforilação que são essenciais para o funcionamento da proteína (FURUYA et al., 2004; NIIDA; NAKANISHI, 2005).

Muitas destas funções são desencadeadas a partir de fosforilações que ocorrem em resíduos de serina ou treonina na região C-terminal da proteína, que acabam por recrutar, ativar ou inibir proteínas relacionadas com suas diferentes funções (Figura 6).

Tabela 1 – Análise da desestruturação da região C-terminal de Rad9 em diferentes espécies

Espécie	Tamanho da proteína (aas)	Tamanho da região desestruturada (%)	Porcentagem de desestruturação (%)
<i>H. sapiens</i>	391	128	32,74
<i>S. cerevisiae</i>	612	223	36,43
<i>S. pombe</i>	426	115	26,99
<i>L. mexicana</i>	705	455	64,53
<i>L. braziliensis</i>	688	365	53,05
<i>L. infantum</i>	717	442	61,64
<i>L. major</i>	718	451	62,81

Fonte: O autor, 2017.

Figura 6 – Diferentes funções de Rad9

Referência: (ISHIKAWA; ISHII; SAITO, 2006)

1.4 Ferramentas de manipulação genética em *Leishmania*

A utilização da genética reversa para estudo de fenótipos relacionados a mutação de determinados genes é essencial para uma melhor compreensão da biologia de organismos, assim como para a descoberta e validação de alvos terapêuticos para o tratamento de doenças. Além da mutação de genes, as pesquisas também têm interesse em nocautear, super-expressar ou complementar genes alvos de estudo.

Em *Leishmania spp.* esses processos são mais desafiadores tendo em vista a instabilidade do genoma, que pode frequentemente passar pelos processos de amplificação ou deleção gênica e aneuploidia de cromossomos (BEVERLEY, 1991; UBEDA et al., 2008). Além disso, estratégias para a geração de mutantes nulos, como a substituição de genes por marcas de seleção através de recombinação homóloga (CRUZ; COBURN; BEVERLEY, 1991) são bem sucedidas quando os genes de interesse não são essenciais à sobrevivência do parasito. O nocaute de genes essenciais pode levar a fenótipos letais, impossibilitando estudos detalhados.

Neste sentido, o desenvolvimento de sistemas de manipulação de genes que possam ser controlados são ferramentas muito úteis. Especificamente para o caso de *L. major*, outras leishmanias do Velho Mundo (como *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*) (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015) e outros tripanossomatídeos como *T. cruzi*, a ausência de enzimas da via mediada por RNA de interferência (RNAi), também é um fator limitante para as possibilidades de manipulação genética (ULLU; TSCHUDI; CHAKRABORTY, 2004).

Como exemplos das estratégias atualmente utilizadas para manipulação de genes em *Leishmania spp.*, temos o nocaute clássico, o sistema regulável mediado pela diCre recombinase (Figura 7), o sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas9 (SOLLELIS et al., 2015; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2015) (Figura 8) e o sistema induzível por tetraciclina (KRAEVA et al., 2014).

Figura 7 – Representação esquemática de diferentes estratégias moleculares para gerar nocautes em *Leishmania*

(a) Alelos endógenos do gene de interesse são sequencialmente substituídos por construções contendo dois cassetes com diferentes marcas de resistência (retângulos pretos ab1 e ab2) que são flanqueados pelas regiões 5' e 3'UTR do gene de interesse, permitindo a recombinação homóloga. A deleção de genes essenciais causam letalidade [representado pelo parasito pontilhado em (a)]. A sobrevivência de mutantes nulos pode ser resgatada pela superexpressão do gene de interesse a partir de um vetor episomal (b) e (c). A Timidina quinase do *Herpes Simplex Virus* permite a seleção negativa contra o episomo que pode ser monitorado seguindo os níveis de expressão de GFP (c). Para mutantes nulos condicionais pela Cre dimerizável (diCre) (d), o primeiro alelo do gene de interesse pode ser substituído pela construção contendo as duas subunidades da Cre fusionadas a FKBP12 (FK506-binding protein) e FRB (domínio de ligação de FKBP12), e um cassete que confere resistência a um antibiótico (ab1). O segundo alelo é substituído por uma construção contendo o gene de interesse flanqueado por sequências Lox e um segundo cassete de resistência a antibiótico (ab2). A dimerização de FKBP12/FRB na presença de rapamicina reconstitui a atividade da Cre recombinase, levando a excisão do segundo alelo do gene de interesse e estabelecimento de um mutante nulo homozigoto. Referência: (SPÄTH; CLOS, 2016)

Figura 8 – Representação esquemática da Cas9 e mecanismos de reparo de quebras da dupla fita de DNA

A utilização de guias de RNA (sgRNA) garantem que a enzima Cas9 (amarela) seja guiada até regiões específicas do genoma e promovam a quebra de dupla fita. As quebras de dupla fita induzidas pela Cas9 podem ser reparadas de duas formas. Na via *Non-Homologous End Joining* (NHEJ), as extremidades geradas na quebra são processadas pela maquinaria endógena de reparo e religadas, o que pode resultar em mutações aleatórias do tipo inserção/deleção (indel) no sítio de religação. Esse tipo de mutação pode resultar em mudanças na fase aberta de leitura e criação de códons de parada prematuros, resultando em nocaute do gene. Alternativamente, um *template* pode ser fornecido na via HDR (*Homologous Direct Repair*, reparação direta por homologia) que permite uma edição precisa. Referência: (RAN et al., 2013)

1.4.1. O sistema diCre recombinase

O sistema de recombinação mediado por Cre/Lox derivado do bacteriófago P1 emergiu como uma poderosa ferramenta para manipulação genética (NAGY, 2000). A enzima catalisa a recombinação sítio-específica entre duas sequências de 34pb chamadas LoxP. Cada LoxP é composto de duas repetições invertidas de 13pb que servem como sítios de ligação para a enzima, e uma sequência central de 8pb que participa no processo de recombinação (VOZIYANOV; PATHANIA; JAYARAM, 1999). Essa sequência central é assimétrica e confere direcionalidade ao sítio Lox. Dependendo então da orientação das sequências Lox a recombinação pode resultar em excisão, inversão ou integração de genes (Figura 9).

Figura 9 – Sistema Cre/Lox de recombinação

(a) Sequência LoxP selvagem. A seta indica a orientação da sequência, que é dada a partir da orientação da sequência central de 8pb. (b) Recombinação entre duas sequências Lox que estão na mesma orientação. A eficiência para a excisão é alta, e a integração pode ocorrer raramente. (c) Recombinação entre sequências Lox com orientação inversa. Neste caso, a recombinação resulta na inversão do DNA flanqueado pelas sequências Lox. Referência: (ARAKI; YAMAMURA, 2012).

Duas importantes características para o melhoramento do sistema de recombinação mediado pela Cre recombinase são as mutações inseridas na sequência LoxP (ALBERT et al., 1995) que quando introduzidos na célula resultam na geração de sequências Lox mutadas com menor eficiência de ligação à Cre recombinase, aumentando a estabilidade da modificação mediada inicialmente.

Uma segunda inovação importante para melhorar a eficiência do uso da Cre recombinase, foi a geração da Cre dimerizável (diCre) (JULLIEN et al., 2003), que conferiu o caráter de regulação a enzima, permitindo que houvesse um controle temporal sobre sua ativação, e assim uma análise mais detalhada dos fenótipos obtidos, ao possibilitar a comparação com células que não

tiveram a enzima ativada (Figura 10). Desta maneira, o sistema passou a funcionar com a expressão da recombinase inicialmente numa forma inativada, mas fusionada a dois peptídeos (FKBP e FRB), que se ligam a rapamicina, e restabelecem a atividade enzimática da Cre recombinase.

Figura 10 – Princípio do sistema mediado pela diCre recombinase

A recombinase é dividida em dois fragmentos sem atividade enzimática, CreN-ter e CreC-ter, que são fusionadas às proteínas FKBP12 e FRB, e podem ser dimerizadas por uma pequena molécula ligante (rapamicina). A dimerização promovida entre as proteínas fusionadas restaura a atividade enzimática de recombinase. Referência: (JULLIEN et al., 2003)

Recentemente foi descrito a utilização do sistema diCre recombinase em *L. mexicana* para promover a excisão de genes de interesse (DUNCAN et al., 2016). Nesse trabalho, o gene essencial CRK3 (*Cdc2-related kinase 3*) foi deletado do genoma, resultando na parada do ciclo celular durante a transição G2/M. Além disso, o nocaute deste gene diminuiu o crescimento dos parasitos quando inoculados em camundongos, demonstrando o potencial terapêutico da deleção de CRK3 e a importância do uso da diCre recombinase para análise de genes essenciais em *Leishmania*.

Entretanto, além da excisão o sistema também pode ser utilizado para mediar a inversão de genes. A partir dessa estratégia, um gene de interesse flanqueado por sequências Lox poderia ser integrado no genoma de forma invertida ao seu sentido de transcrição, ou seja, sem haver a expressão, e após ativação da recombinase via rapamicina (RAP), poderia haver a expressão regulada de tal gene (Figura 9c).

2. Objetivos

A partir da problematização apresentada na introdução, a presente dissertação tem como objetivos:

(1) O desenvolvimento de um sistema de expressão de genes de interesse utilizando o sistema diCre recombinase. Para isso, estabelecemos em *L. major* a linhagem diCreGFP^{Lox}, que possui integrada no locus ribossômico um fragmento contendo os genes da Cre recombinase, e outro contendo o gene que codifica para a proteína GFP invertida e flanqueada pelas sequências Lox. Nesta linhagem avaliamos a prova de princípio, através da dinâmica de inversão da GFP.

(2) A aplicação deste sistema para a caracterização do domínio C-terminal da proteína Rad9 de *L. major*. Utilizamos o sistema previamente desenvolvido para o estabelecimento de linhagens expressando duas versões de Rad9; uma versão truncada da proteína, sem o domínio C-terminal, e uma versão controle com a proteína inteira. Ambas possuem o epítipo de hemaglutinina (HA) em fusão ao gene de Rad9. Nestas linhagens buscamos acessar alguns dos papéis do domínio C-terminal que sejam importantes para a compreensão do funcionamento do complexo 911.

3. Materiais e métodos

3.1. Cepa de *L. major* utilizada, cultivo e protocolo transfecção

A linhagem selvagem de *L. major* utilizada neste trabalho foi a CC1, clone (MHOM/IR/84/LT252), formas promastigotas. Todas as demais linhagens foram derivadas desta linhagem selvagem. O cultivo foi realizado a 26°C em meio M199 1X (Sigma-Aldrich), suplementado com Hepes 0,04M; adenina 0,1mM; biotina 50µg/mL; hemina 250µg/mL e soro fetal bovino 10%. Nas linhagens geneticamente modificadas, as concentrações das drogas de seleção e de rapamicina para indução da diCre recombinase utilizadas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Drogas de seleção e indução da diCre recombinase

Droga	Concentração da solução-estoque	Concentração utilizada
Cloridrato de blasticidina (BLA) (Sigma)	10mg/mL	10µg/mL
Cloridrato de puromicina (PUR) (Sigma)	10mg/mL	10µg/mL
Rapamicina (RAP) (Sigma)	10µM	Indicado em cada experimento

Fonte: O autor, 2017

As transfecções foram realizadas em eletroporador Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad), em cubetas de 0,4cm (Sigma), em dois pulsos com voltagem de 1600V, capacitância de 25F e resistência ∞Ω. 50mL de células no início da fase exponencial de crescimento foram lavadas em tampão de eletroporação (120mM KCl; 0,15mM CaCl₂; 10mM K₂HPO₄; 25mM Hepes; 2mM EDTA; 5mM MgCl₂) e submetidas aos dois pulsos de eletroporação. A recuperação foi feita em M199 1X, suplementado com 20% de soro fetal bovino. Após 18 horas de recuperação seguiu-se protocolo de seleção através de diluição limitante (1:6, 1:72 e 1:864, em placas de 96 poços). Entre 10 a 20 dias após a transfecções, clones foram isolados e mantidos em M199 1X, suplementado com a droga de seleção adequada. Alíquotas foram armazenadas no freezer -70°C, em M199 1X, contendo glicerol 10%.

3.2. Densidade de parasitos e curvas de crescimento

A densidade dos parasitos foi determinada contando as células em câmaras de Neubauer. Para a realização das curvas de crescimento e indução pela diCre recombinase, foi feito um inóculo de 1×10^5 células/mL. A densidade da cultura foi determinada diariamente para a realização dos experimentos. De acordo com a necessidade, a diluição da cultura foi feita na proporção de 1:10, com posterior correção deste fator de diluição.

3.3. Análises de bioinformática

Análises de bioinformática foram realizadas em programas disponíveis na internet, com as referências encontrando-se nas legendas de cada figura. Os parâmetros utilizados em cada análise estão de acordo com o sugerido em cada programa e também constam nas legendas.

3.4. Extração de DNA genômico e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA genômico foi extraído utilizando o DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) a partir de células em fase exponencial de crescimento, cultivadas em 20 ou 30mL. Foram seguidas as instruções do fabricante e o DNA foi quantificado no BioPhotometer (Eppendorf) para utilização nas reações de PCR. O armazenamento foi feito a -20°C .

Nas PCRs foram utilizadas as enzimas *Taq* DNA Polymerase (Thermo) ou Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, NEB). Os componentes de cada reação encontram-se nas Tabelas 3 e 5. As condições utilizadas com cada enzima encontram-se nas Tabelas 4 e 6. Os pares de primers utilizados e as respectivas temperaturas de associação (T_a) estão listados no Apêndice II.

Tabela 3 – Protocolo de PCR utilizando *Taq* DNA Polymerase

Componente	Concentração utilizada
Água	-
Tampão 10X	1X
MgCl ₂ 50mM	1,5mM
dNTP mix 25mM	0,2mM cada
DMSO 100%	5%
Primer 1 50µM	0,5µM
Primer 2 50µM	0,5µM
DNA	100ng
Taq 5U/µL	1U

Referência: (“*Taq* DNA Polymerase, recombinant (5 U/µL)”, 2017)

Tabela 4 – Condições de PCR utilizando *Taq* DNA Polymerase

Fase	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	95°C	5 min
Desnaturação	94°C	45 s
Anelamento	Ver Anexo II	45 s
Extensão	72°C	60 seg/kb
Extensão final	72°C	5 min
	10°C	<i>Hold</i>

Tabela 5 – Protocolo de PCR utilizando Phusion® High Fidelity DNA Polymerase

Componente	Concentração utilizada
Água	-
Tampão HF 5X	1X
dNTP mix 25mM	0,2mM cada
DMSO 100%	5%
Primer 1 50µM	0,5µM
Primer 2 50µM	0,5µM
DNA	50ng
Phusion 2U/µL	0,5U

Referência: (“Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase”, 2017)

Tabela 6 – Condições de PCR utilizando Phusion® High Fidelity DNA Polymerase

Fase	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	98°C	30 s
Desnaturação	98°C	5 s
Anelamento	Ver Anexo II	15 s
Extensão	72°C	15 seg/kb
Extensão final	72°C	5 min
	10°C	<i>Hold</i>

3.5. Eletroforese em gel de agarose

As eletroforeses foram feitas em gel de agarose 0,8%, utilizando tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X. Como marcador padrão de peso molecular foram utilizados λ -DNA digerido com HindIII ou 1kb Plus DNA Ladder (Thermo). Os geis foram corados em solução de brometo de etídeo e visualizados no fotodocumentador (Doc-ItLS, AnalytikJena) ou no ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare).

3.6. Clonagens

Para as clonagens os fragmentos de interesse contendo sítios de enzimas para direcionar a ligação foram obtidos a partir de amplificação por PCR, digeridos e ligados em vetor também previamente digerido e desfosforilado. O produto de ligação foi purificado, precipitado e transformado em células competentes, que foram plaqueadas em meio LB com o antibiótico de seleção adequado do vetor (Ampicilina 100 μ g/mL). Após crescimento *overnight*, cerca de 10 a 15 clones foram analisados em relação ao perfil de digestão por endonuclease de restrição e confirmados por sequenciamento.

3.6.1. Digestão com enzimas de restrição e purificação

As enzimas de restrição utilizadas encontram-se indicadas ao longo do texto. Nos casos de digestão com única enzima foram seguidas as recomendações do fabricante para uso de tampão, com incubação a 37°C, por 14 a 16 horas. Nos casos de digestões duplas, o melhor tampão em que ambas enzimas possuísem máxima atividade foi utilizado. A determinação desses tampões também foi feita no site do fabricante, e se necessário, houve ajuste na concentração da enzima com menor atividade. Os produtos de digestão foram visualizados em gel de agarose para confirmar a digestão, e purificados com o Illustra GFX PCR DNA and Gel band purification kit (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante.

3.6.2. Reações de ligação

As reações com T4 DNA ligase (Thermo) foram realizadas com 50 a 100ng do vetor linearizado com as enzimas de restrição adequadas para cada clonagem, DNA inserto na proporção de 3:1 em relação ao vetor, buffer da T4 DNA ligase 1X, 1 Unidade da T4 DNA ligase, e água para um volume final de 20µL de reação. As amostras foram incubadas a 4°C, *overnight*, seguidas por purificação.

A purificação foi feita adicionando 80µL de água a reação de ligação, e 100µL de fenol, seguido por centrifugação por 5 min, 16.000g. A fase aquosa foi coletada e adicionados mais 100µL de clorofórmio, seguido por nova centrifugação nas mesmas condições. A fase aquosa foi coletada e precipitada utilizando etanol absoluto gelado 2V, acetato de sódio 3M pH 5,3 0,1V e GlycoBlue coprecipitant (Thermo) 45µg, centrifugando por 15 min a 12.000g. O etanol foi descartado, e o pellet foi lavado com 500µL de etanol 70% gelado, seguido por nova centrifugação. Em seguida o etanol foi descartado, e o pellet foi ressuscitado em 20µL de água.

3.6.3. Células eletrocompetentes e eletroporação

MAX Efficiency® DH10B™ Competent Cells (Thermo), genótipo F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara,leu)7697 galU galK λ - rpsL nupG /pMON14272 / pMON7124 foram crescidas em meio Luria-Bertani (LB) *overnight*. Um inóculo foi feito em meio TY (triptona 20g/L e extrato de levedura 5g/L) e o crescimento foi monitorado até OD₆₀₀ de 0,35 a 0,40. Neste momento as células foram centrifugadas (0°C, 5 min, 5000rpm); Em seguida foram lavadas duas vezes em água MilliQ estéril e gelada, depois em glicerol 10% estéril e gelado com alíquotas de 40 μ L armazenadas a -80°C.

A eletroporação foi feita no *E. coli* Pulser™ com cubetas de 0,2cm, utilizando uma alíquota de 40 μ L de células competentes e 10 μ L da ligação previamente purificada. Foi aplicado um pulso com 2,5V, seguido por recuperação das células em meio LB por 1 hora a 37°C, sob agitação de 240rpm. Após o período de recuperação, as células foram plaqueadas em meio LB sólido complementado com o antibiótico de seleção e incubadas *overnight* em estufa a 37°C.

3.6.4. Extração de plasmídeos

A extração dos plasmídeos foi feita utilizando o QIAprep® Spin Miniprep kit (QIAGEN), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

3.6.5. Reações de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo). Foi utilizado 5 μ L do DNA molde, 3,2pmol do primer, BigDye sequencing buffer 1X, Terminator Ready Reaction mix 1X e água para um volume final de 20 μ L. As amostras foram

submetidas ao seguinte ciclo: desnaturação por 5 min a 95°C, 40 ciclos de desnaturação por 30 seg, 95°C, anelamento por 30 seg a 50°C, extensão por 4 min a 60°C.

Os produtos foram precipitados com 80µL de isopropanol 65%, incubados por 10 min a temperatura ambiente, seguido por centrifugação a 14.000 rpm por 25 min. Foi adicionado 250µL de etanol 60% e nova centrifugação nas mesmas condições. O etanol foi retirado e as amostras foram armazenadas a -20°C até a análise no 3130 Genetic Analyzer (Thermo).

As sequências foram analisadas no programa SeqScanner v.2.0 (Applied Biosystems).

3.7. Análise de proteínas

3.7.1. Extrato total de proteínas

Inicialmente as células tiveram sua densidade determinada, em seguida foram centrifugadas (1400×g, 5 min, 25°C) e lavadas em PBS 1X. O pellet foi mantido no gelo até ser ressuspensionado na concentração de 10^5 ou 2.10^5 células/µL em tampão de amostra contendo Tris-HCl pH 6,8 300mM, glicerol 50% (v/v), SDS 10% (m/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v), e azul de bromofenol 0,1% (v/v). As amostras foram armazenadas a -80°C até serem resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

3.7.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE

Todas as análises foram realizadas em gel de poliacrilamida na concentração de 10%, exceto nas legendas que estiverem indicando o contrário. Foi utilizado tampão de corrida contendo Tris 25mM, glicina 250mM e SDS 0,1% (p/v). Para um volume de 10mL de gel de separação, foram adicionados 4mL de água; 3,3mL de mix de acrilamida (29% acrilamida 1% bis-acrilamida); 2,5mL Tris 1,5M pH 8,8; 100µL SDS 10%, 100µL de persulfato de amônio 10% e 4µL de TEMED. Para um volume de 4mL de gel de

empilhamento foram adicionados 2,7mL de água, 670µL de mix de acrilamida, 500µL de Tris 1M pH 6,8, 40µL de SDS 10%, 40µL de persulfato de amônio 10%, 4µL de TEMED e 1µL de azul de bromofenol 1%.

Ao final da corrida o gel foi transferido para membrana de PVDF (GE Healthcare) em sistema semi-seco TE 70 PWR (Amersham) com tampão de transferência contendo Tris 24mM, glicina 192mM e metanol 20%. A transferência foi feita por 2 horas, a 50mA por gel.

3.7.3. Western blotting (WB)

A membrana foi bloqueada em solução de leite desnatado 10%, seguido por incubação com anticorpo primário diluído em PBS-Tween (PBS-T) e leite desnatado 3%. Depois, foram realizadas 4 lavagens de 5 minutos cada em solução PBS-T e incubação com anticorpo secundário. Em seguida foram feitas 4 lavagens de 5 minutos em solução de PBS-T, e a membrana foi revelada utilizando Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) em Amersham™ Hyperfilm (GE Healthcare). Detalhes da diluição e tempos de incubação de cada anticorpo utilizado encontram-se descritos no Apêndice III.

3.8. Imunofluorescência (IF)

Cerca de 1.10^5 céls/mL foram lavadas em PBS 1X e ressuspensas em solução fixadora contendo paraformaldeído 3,7% diluído também em PBS. Em seguida as células foram agitadas levemente por 10 min, lavadas e ressuspensas em PBS 1X até o momento da execução do protocolo de IF.

Para o protocolo de IF, as células previamente fixadas foram lavadas em PBS 1X e aderidas por 30 min em *slides* previamente tratados com 40µL de poli-L-lisina. Em seguida foram lavadas por duas vezes em PBS 1X e permeabilizadas por 30 min em PBS 1X com Triton X-100 (Sigma Aldrich) 0,3%. Para o bloqueio as células permeabilizadas foram lavadas 5 vezes em

PBS 1X, e incubadas com PBS 1X e BSA 2% por uma hora, a temperatura ambiente. Após, o anticorpo primário foi adicionado na concentração de 1:1000 para anti-hemaglutinina (Sigma) e 1:500 para anti-tubulina clone KMX-1 (Millipore) e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Previamente a adição do anticorpo secundário as células foram lavadas por 8 vezes com PBS 1X e então incubadas com anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor® 488 ou 594 (Thermo), na diluição de 1:500 em PBS 1X, por 30 min, à temperatura ambiente e protegido da luz. Ao final do período de incubação com o anticorpo secundário, as células foram lavadas por mais 8 vezes com PBS 1X, e o DNA foi corado com Hoechst 33342 (Thermo) 2µg/mL, por 15 min, à temperatura ambiente e protegido da luz. Para finalizar as células foram lavadas uma vez em PBS e cerca de 15µL de meio de montagem ProLong® Gold Antifade reagent (Thermo) foi adicionado a cada um dos *slides*, seguido pela lamínula. As lâminas foram armazenadas a 4°C até a análise no Leica CTR 6000 Fluorescence Microscope ou microscópio multifóton.

3.9. Citometria de Fluxo

As análises de citometria de fluxo foram realizadas no equipamento BD FACSDIVA™ (BD Biosciences). 5×10^6 a 1×10^7 células/mL foram lavadas em PBS 1X suplementado com 5mM EDTA e ressuspensas em PBS 1X contendo 70% de metanol.

Para análise do conteúdo de DNA as células foram lavadas em PBS 1X para retirada do metanol e ressuspensas em PBS 1X com EDTA 5mM, iodeto de propídio (IP) 10µg/mL, RNaseA 10µg/mL (Invitrogen) e incubadas protegidas da luz por 45 min. Em seguida foram filtradas em 100µM Cell Strainers (Thermo) e transferidas para os tubos adequados para análise.

Para análise de progressão durante o ciclo celular, células em fase exponencial de crescimento foram sincronizadas através do tratamento com hidroxíureia (HU) 5mM por 8 horas (SVÄRD; TROELL, 2017). Anterior ao tratamento com HU, amostras controle sem a presença de HU foram coletadas e fixadas segundo protocolo descrito anteriormente. Após o período de

incubação com HU, as células foram lavadas em meio 199 1X e inoculadas em meio sem droga.

As células foram coletadas a cada duas horas, por um período máximo de 12 horas. Previamente à análise as células foram coradas com IP, conforme protocolo descrito.

4. Resultados

4.1. Estabelecimento da linhagem diCreGFP^{Lox} em *L. major*

Para o estabelecimento do sistema de expressão induzível em *L. major* inicialmente foi gerada a linhagem diCreCC1, que possui um fragmento integrado por recombinação homóloga no locus ribossômico (gene 18S) contendo a Cre recombinase dividida em duas subunidades fusionadas aos peptídeos FKBP e FRB (Figura 11a).

Esta linhagem foi selecionada em 10µg/mL BLA e passou a expressar as subunidades da recombinase na forma inativa, mas na presença da molécula rapamicina (RAP), que se liga aos peptídeos FKBP e FRP, as subunidades da enzima são dimerizadas e a Cre recombinase tem sua atividade restabelecida.

De posse da linhagem diCreCC1 foi transfectado um fragmento de aproximadamente 6kb que contém o gene da GFP invertido em relação ao sentido de transcrição do locus ribossômico e com o epítipo de hemaglutinina (HA) em fusão N-terminal ao gene (Figura 11b). Além disso, as sequências Lox66 e Lox77 estão flanqueando GFP-HA, uma vez que estas sequências são necessárias para serem reconhecidas pela enzima diCre recombinase ativada, que irá mediar a inversão de GFP-HA. Assim, GFP ficará no mesmo sentido de transcrição do locus ribossômico e passará a ser expresso.

A nova linhagem gerada, diCreGFP^{Lox}, foi selecionada com 10µg/mL BLA e 10µg/mL PUR. Detalhes da construção utilizada encontram-se no Apêndice IV.

O DNA genômico da linhagem diCreGFP^{Lox} foi extraído e por PCR analisou-se a presença dos fragmentos contendo a diCre recombinase e GFP invertido que foram integrados no ribossomo. Na reação foi utilizado um oligonucleotídeo que se anela à montante do fragmento integrado (OL2380) e um oligonucleotídeo que se anela na marca de seleção (OL4355 ou OL15) (Figura 11c). Desta maneira, a detecção de produtos de amplificação mostra que ambos fragmentos se encontram integrados corretamente no locus ribossômico de *L. major*.

Figura 11 – Representação esquemática e análise por PCR da linhagem diCreGFP^{Lox}

(a) Representação esquemática simplificada do fragmento que expressa as duas subunidades da Cre recombinase, fusionados a FKBP e FRB, e selecionados com BLA. (b) Representação esquemática simplificada do fragmento que expressa GFP invertido, fusionado à HA e flanqueado pelas sequências Lox, selecionado com PUR. Em ambas representações as setas indicam os sítios aproximados de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados para fazer a análise por PCR. (c) Produtos de amplificação caracterizando a presença dos fragmentos contendo a diCre recombinase e GFP^{Lox} integrados no locus ribossômico. Estes produtos foram detectados apenas na linhagem diCreGFP^{Lox}, e ausentes na linhagem selvagem WT. O gene da diidrofolato redutase timidilato sintase (DHFR-TS) foi utilizado como controle endógeno.

4.1.1. Desenvolvimento de um vetor para clonagem de genes de interesse com epítipo HA C-terminal

O vetor pGL2332, que contém GFP invertido e flanqueado pelas sequências Lox, possui alguns sítios de enzimas de restrição que permitem a clonagem de outros genes de interesse substituindo onde GFP encontra-se clonado. Entretanto, se for de interesse manter o epítipo de HA em fusão, as proteínas resultantes só poderiam ter essa etiqueta na posição N-terminal. Com o intuito de ter um vetor que permitisse a clonagem de genes de interesse com o epítipo HA na posição C-terminal, este vetor foi redesenhado, incluindo um Sítio Múltiplo de Clonagem (SMC) e HA na posição C-terminal, gerando o vetor pGL2332-C.

Para estabelecimento deste novo vetor, 6xHA foi amplificado por PCR do vetor pGL631-6xHA (Figura 12a), utilizando o par de oligonucleotídeos já contendo o SMC com as enzimas BglII, NdeI e SdaI. Além disso, para direcionar a ligação, o par de oligonucleotídeos possuía em suas extremidades os sítios de NheI e KpnI. O vetor pGL2332 foi digerido com NheI e KpnI (Figura

12b), e o produto de amplificação foi ligado, gerando diversos clones que foram analisados por análise de restrição (Figura 12c) e sequenciamento. Os vetores utilizados encontram-se no Apêndice V.

Figura 12 – Geração do vetor pGL2332-C

(a) Amplificação de 6xHA do vetor pGL631-6xHA. (b) Digestão do vetor pGL2332 com NheI e KpnI, liberando o fragmento de aproximadamente 0,7kb contendo GFP-6xHA, que será substituído pelo produto amplificado em “a”. (c) Análise do perfil de digestão enzimática dos clones do vetor pGL2332-C digeridos com a enzima XhoI e SmaI, mostrando a presença dos fragmentos de 7758 e 321pb, que indicam a presença do inserto clonado adequadamente. Os clones que não tivessem o inserto de maneira adequada, não possuiriam o sítio de SmaI, e seria visualizado uma banda única de 8725pb. O sequenciamento foi realizado para confirmação do SMC.

4.1.2. Tratamento com rapamicina: análise do perfil de crescimento e da progressão no ciclo celular

A rapamicina é uma conhecida molécula inibitória da quinase TOR (*Target of Rapamycin*) (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006). Esta quinase está envolvida em diferentes aspectos do metabolismo, como o crescimento celular, biogênese de ribossomos, importação de nutrientes, e inibição da autofagia.

São descritas duas isoformas de TOR em leveduras e células de mamíferos (LAPLANTE; SABATINI, 2012), com ambas possuindo diferentes sensibilidades à inibição por rapamicina.

Em *L. major* foi descrita uma terceira isoforma (MADEIRA DA SILVA; BEVERLEY, 2010), mas cujos efeitos inibitórios pela rapamicina não foram descritos.

Para verificar se o tratamento com rapamicina poderia interferir com alguns aspectos da fisiologia da célula, o perfil de crescimento foi analisado em três linhagens que foram tratadas com 300nM de rapamicina, extrapolando, por margem de segurança, a maior concentração de droga utilizada neste trabalho que foi de 100nM. As três linhagens submetidas ao tratamento foram: 1) selvagem, *L. major* CC1; 2) *L. major* expressando apenas diCre (diCreCC1); e 3) *L. major* diCreGFP^{Lox} (Figura 13).

Figura 13 – Perfil de crescimento de diferentes linhagens após tratamento com rapamicina

Perfil de crescimento de linhagens mantidas (círculo preto) ou não (círculo branco) em 300nM de rapamicina. A partir de um inóculo inicial de 1×10^5 células/mL em todas as linhagens, não foi detectada variação no crescimento das linhagens expostas ao tratamento em relação ao seu controle. A representação encontra-se em escala linear, e a representação em escala logarítmica está presente no Apêndice VI.

A partir da comparação do perfil de crescimento de células na presença ou ausência de rapamicina, pode-se inferir que na linhagem WT o tratamento não interfere com a fisiologia da célula a ponto de prejudicar seu crescimento. Da linhagem diCreCC1, o tratamento mostra que a ativação da recombinase, sem que exista um alvo (sequência Lox) para que a recombinação seja mediada, também não interfere com o crescimento das

células. Portanto, eventuais efeitos no crescimento de linhagens induzidas seriam devidos à expressão do gene de interesse, e não relacionados à expressão ou funcionamento da diCre recombinase. Por fim, a expressão condicional de GFP associada à ativação da recombinase na linhagem diCreGFP^{Lox} mostra que o sistema funcionando reconhecendo sequências flanqueadas por Lox66/Lox77 não interfere com o crescimento das células.

O perfil de progressão no ciclo celular também foi analisado após tratamento das células com RAP 300nM por 48 horas, seguido por sincronização com HU 5mM por 8 horas (Figura 14).

Figura 14 – Perfil de progressão no ciclo celular de diferentes linhagens após sincronização com HU

Em cinza estão as linhagens que não foram tratadas com rapamicina, e em vermelho-claro as linhagens tratadas com 300nM por 48 horas. As células foram tratadas com HU 5mM por 8 horas para sincronização do ciclo, depois liberadas em meio fresco sem HU, e então coletadas a cada 4 horas para análise da progressão.

4.1.3. Prova de conceito: expressão regulada de GFP após indução com rapamicina

Inicialmente foi extraído o DNA genômico da linhagem induzida por 48 horas com RAP 100nM e de seu controle sem indução. Utilizando uma combinação de oligonucleotídeos que só geraria produto se houvesse a inversão de maneira correta (Figura 15a), foram feitas reações de PCR para avaliar a inversão (Figura 15b).

Figura 15 – Análise da inversão por PCR

(a) Representação esquemática da inversão de GFP mediada pela diCre recombinase após tratamento com rapamicina. As setas indicam os sítios aproximados de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados para avaliar a inversão. (b) Produtos de amplificação após a combinação de oligonucleotídeos OL2380 + GFP-a ou OL15 + GFP-b. DHFR-TS foi utilizado como controle endógeno da reação.

Para avaliar a expressão de GFP, a linhagem diCreGFP^{Lox} foi induzida com 0, 2 e 100nM RAP por 48 horas, e alíquotas foram coletadas às 24 e 48 horas para análise da expressão de GFP por WB (Figura 16a).

A quantificação dos dados normalizados em relação ao controle endógeno EF1 α (Figura 16b) mostra que há um aumento na expressão da proteína às 48 horas quando comparado às 24 horas de indução em ambas condições de tratamento (2 e 100nM).

Quando comparado um mesmo período de tempo, a expressão de GFP é maior quando se utiliza maior concentração de rapamicina, mostrando

que há uma relação de dependência entre tempo e dose de droga utilizados para indução.

Figura 16 – Expressão regulada de GFP após tratamento com rapamicina

(a) Após tratamento com 2 e 100nM as células foram coletadas às 24 e 48 horas, e extratos totais foram realizados para análise por WB, utilizando anticorpo anti-HA (epítipo expresso em fusão com GFP). EF1α foi utilizado como controle endógeno. (b) As variações nos níveis de GFP foram quantificadas na transição entre as 24 horas de tratamento. Foi detectado aumento de 1,68X para tratamento com 2nM e 2,93X no tratamento com 100nM.

O ensaio de imunofluorescência (IF) foi realizado com as células induzidas por 48 horas, com 0, 2 e 100nM RAP (Figura 17). Utilizou-se anticorpo anti-HA (epítipo expresso em fusão com GFP) para avaliar o nível de expressão e distribuição da proteína nas células induzidas.

A quantificação deste dado mostra que a expressão de GFP parece ser maior quando as células são induzidas com 100nM, assim como visto no WB. A expressão de GFP foi detectada no mínimo em 85% das células (Figura 17).

Figura 17 – IF após indução de diCreGFP^{Lox} com 0, 2 e 100nM RAP

À esquerda, exemplos de células encontradas na IF anti-HA utilizando Alexa[®] 594 (Thermo) como anticorpo secundário. Para fins didáticos, as células foram coloridas para verde artificialmente no programa ImageJ. À direita, quantificação das células submetidas ao protocolo de IF. As porcentagens indicam a quantidade de células que possuem sinal de HA acima do *Background*, que foi definido a partir da quantificação média das células sem rapamicina.

4.2. Aplicação do sistema diCre em Leishmania: estudo da região C-terminal da proteína Rad9

Análises anteriores realizadas pelo nosso grupo de pesquisa sugerem que Rad9 é uma proteína essencial para a sobrevivência de *L. major*, não sendo possível gerar linhagens nocautes Rad9^{-/-} (DAMASCENO et al., 2016).

Com o intuito de utilizar a ferramenta previamente descrita para expressão de genes de interesse, a segunda parte do trabalho mostra a aplicação deste sistema para o estudo da proteína Rad9. Assim, o gene Rad9 (LmjF.15.0980) foi clonado em duas versões no vetor pGL2332-C (mapa no Apêndice V) para integração no locus ribossômico da linhagem previamente apresentada, diCreCC1.

4.2.1. Análises de bioinformática

Análises da estrutura de Rad9 em outros homólogos mostram que a proteína possui uma região C-terminal intrinsicamente desestruturada. O homólogo humano foi melhor caracterizado, tendo sua estrutura cristalográfica resolvida (DORÉ et al., 2009; SOHN; CHO, 2009). Neste modelamento foi possível observar que a proteína humana com 391 aminoácidos, só tem seus primeiros 263 aminoácidos modelados em uma estrutura tridimensional, e os 128 aminoácidos restantes fazendo parte do domínio C-terminal desestruturado.

A partir deste dado, buscamos verificar se o homólogo de Rad9 em *L. major* também apresentaria um domínio desestruturado. Para isso, utilizamos o programa Phyre² (Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0, <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) (KELLEY et al., 2015), que faz a predição de estrutura tridimensional baseada na homologia entre proteínas.

Foi verificado que em Rad9 de *L. major*, dos seus 718 aminoácidos, apenas os 267 primeiros conseguem ser modelados em uma estrutura terciária (Figura 18).

Figura 18 – Modelamento tridimensional predito para Rad9 de *L. major* utilizando o programa Phyre²

Modelamento tridimensional realizado com o programa Phyre². Semelhante ao que ocorre com o homólogo humano, Rad9 de *L. major* também não tem sua sequência inteira remodelada em uma estrutura tridimensional. Dos 718 aminoácidos, apenas os 267 primeiros resíduos são modelados. Em humanos, dos 391 aminoácidos, os primeiros 263 resíduos formam uma estrutura terciária. N e C representam as regiões N e C-terminal da proteína, respectivamente.

Para corroborar os dados encontrados nesta primeira análise, utilizamos o programa PyMOL (<http://pymol.org/>) para modelamento e comparação entre as estruturas de Rad9 de *L. major* e seu homólogo humano (HsRad9) (Figura 19).

Semelhante à estrutura tridimensional descrita para HsRad9, nesta análise apenas os 263 primeiros aminoácidos da proteína humana (resíduos 2 ao 265) conseguem ser modelados em uma estrutura tridimensional, e para Rad9 de *L. major*, 236 aminoácidos foram modelados (resíduos 4 ao 240 de 718).

Figura 19 – Comparação das estruturas tridimensionais de HsRad9 e Rad9 de *L. major*

Predição da estrutura tridimensional gerada pelo programa PyMOL. A extremidade N-terminal das proteínas está marcada em azul, e a extremidade final que corresponde aos aminoácidos 265 ou 240 para HsRad9 e Rad9, respectivamente, está representado em vermelho.

A análise do domínio C-terminal de Rad9 também foi feita no programa IUPred (<http://iupred.enzim.hu>) (DOSZTANYI et al., 2005a; DOSZTÁNYI et al., 2005b), que faz a predição de domínios não estruturados em proteínas.

Assim como já descrito no homólogo humano, esta análise mostrou a presença de um domínio intrinsecamente desestruturado a partir do aminoácido 265 para HsRad9. Já na Rad9 de diferentes espécies de *Leishmania*, o domínio também foi encontrado. Entretanto, em espécies como *L. major* e *L. mexicana*, a predição da estrutura terciária mostra que o remodelamento do domínio C-terminal é menor quando comparado a *L. tarantolae* ou *L. infantum* (Figura 20).

Figura 20 – Predição de estruturas desordenadas nos diferentes homólogos de Rad9

À esquerda estão representadas as estruturas tridimensionais das proteínas geradas pelo programa PyMOL. À direita, estão as representações gráficas geradas pelo programa IUPred, onde a linha vermelha mostra o grau de desestruturação observado ao longo da sequência de aminoácidos. As barras azuis representam os domínios que são ordenados, ou seja, que segundo o programa possuem uma estrutura tridimensional ordenada.

Uma característica observada na região C-terminal desestruturada de Rad9, são os resíduos de serina/treonina (Ser/Tre) que podem ser alvos de fosforilação importantes para a função da proteína.

Em humanos, diferentes sítios já foram descritos, como Ser272 (ROOS-MATTJUS et al., 2003), Ser423 e Tre412 (FURUYA et al., 2004), Ser 387 (DELACROIX et al., 2007), Ser328, Ser277 e Ser336 (ZHAN et al., 2012); e cada um desempenha um papel importante na resposta a danos ao DNA.

Visando uma melhor compreensão da localização destes sítios, foi feita a predição e comparação dos sítios de fosforilação em HsRad9 e Rad9 de *L. major* (Figura 21) usando o programa NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) (BLOM et al., 2004).

A proporção dos resíduos Ser/Tre preditos para serem fosforilados nas duas espécies é de 5,88% para HsRad9 e 6,54% para Rad9 de *L. major*.

Figura 21 – Predição dos sítios de fosforilação em HsRad9 e LmRad9

Potenciais sítios de fosforilação preditos pelo programa NetPhos. Estão representados os resíduos de serina, treonina e tirosina com probabilidade maior de 70% de sofrer esse tipo de modificação pós-traducional. É interessante notar que no caso de HsRad9, que já possui alguns sítios caracterizados, a predição confirma esses sítios como sendo fosforilados (exemplo dos resíduos de Ser 272, 277, 328, 336 e 387).

4.2.2. Versões truncadas de Rad9 e clonagem no vetor de expressão

Baseado na localização das sequências desestruturadas na região C-terminal de Rad9, a proteína de *L. major* foi subdivida em três domínios (Figura 22): A, compreendendo a porção N-terminal que é estruturada em todas as espécies do parasito; B, compreendendo a primeira região desordenada que em algumas espécies ainda há o modelamento numa estrutura terciária; e C, que compreende a região C-terminal desestruturada em todas os homólogos de *Leishmania* pesquisados para este estudo.

Figura 22 – Divisão de Rad9 de *L. major* em domínios A, B e C

O eixo X do gráfico representa a sequência de aminoácidos e o eixo Y a tendência de estruturas desordenadas ao longo da proteína. A barra azul mostra as regiões que o programa IUPred estima como sendo estruturadas. A linha vermelha representa tendência que resíduo tem de estar numa região intrinsecamente desestruturada ou não. O domínio A compreende os resíduos de aminoácidos 1 ao 240. O domínio B compreende os resíduos 241 a 370, e o domínio C, os resíduos 371 a 718.

A partir desta subdivisão decidiu-se gerar uma versão truncada de Rad9 que tivesse o domínio “C” ausente (Rad9AB). A escolha desta versão foi feita visando manter em Rad9 a região que seria necessária para a formação do complexo 911 (Rad9-Hus1-Rad1).

Foram desenhados oligonucleotídeos para amplificar duas versões da proteína, um par que amplifica Rad9AB e um que amplifica toda a ORF (*Open Reading Frame*, Fase Aberta de Leitura) do gene (Rad9ABC), com o intuito de gerar uma linhagem controle.

Foi escolhido o vetor pGL2332-C, que adiciona o epítipo HA C-terminal em fusão ao gene de interesse, para clonar estes produtos. Deste modo, Rad9AB e Rad9ABC foram amplificados por PCR, digeridos com as enzimas de restrição BglII e NdeI, que permitiram a clonagem direcionada no vetor também digerido com estas enzimas (Figura 23).

Os clones obtidos foram sequenciados para confirmar que o gene de interesse e o epítipo HA estavam na mesma fase de leitura. Os mapas com a representação esquemática dos insertos Rad9AB e Rad9ABC clonados no vetor pGL2332-C estão no Apêndice VII.

Figura 23 – Amplificação e digestão de Rad9AB e Rad9ABC e digestão do vetor pGL2332-C

O vetor pGL2332-C foi digerido com as enzimas BglII e NdeI, presentes no SMC (Sítio Múltiplo de Clonagem), assim como os produtos de amplificação por PCR, permitindo a ligação direcionada dos insertos no vetor.

4.2.3. Estabelecimento da linhagem diCreRad9ABC^{Lox} e diCreRad9AB^{Lox}

Uma vez clonadas as duas versões de Rad9 no vetor para integração no locus ribossômico, prosseguiu-se para a geração das duas linhagens expressando Rad9AB e Rad9ABC.

Os vetores foram digeridos com *PacI* e *PmeI*, desfosforilados, precipitados e cerca de 10µg foram transfectados na linhagem diCreCC1. Assim foram estabelecidas duas linhagens: diCreRad9ABC^{Lox} e diCreRad9AB^{Lox} (Figura 24).

Figura 24 – Análise da integração de diCre recombinase e fragmentos contendo Rad9ABC^{Lox} e Rad9AB^{Lox}

(a) Representação esquemática do fragmento contendo as duas subunidades da Cre recombinase integrados no locus ribossômico. (b) Representação esquemática dos fragmentos contendo Rad9AB e Rad9ABC que foram integrados no locus ribossômico. rRNA representa as regiões utilizadas para recombinação homóloga, BLA a marca de seleção à blasticidina, PUR a marca de seleção à puomicina, as setas representam os sítios aproximados de anelamento dos oligonucleotídeos utilizado nas PCRs diagnósticas. Lox66 e Lox77 indicam as regiões necessárias para inversão a serem reconhecidas pela Cre recombinase. DHFR-TS foi utilizado como controle da reação.

4.2.4. Expressão regulada de Rad9 truncada após indução com rapamicina e perfil de crescimento

Após o estabelecimento e confirmação das linhagens diCreRad9ABC^{Lox} e diCreRad9AB^{Lox}, elas foram submetidas ao tratamento com RAP 100nM por 48 horas. O DNA genômico foi extraído para avaliar a inversão por PCR (Figura 25).

Figura 25 – Avaliação da inversão de Rad9ABC e Rad9AB por PCR

(a) Representação esquemática mostrando os sítios de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados para avaliar a inversão. O produto de amplificação dos oligonucleotídeos OL15 e Rad9XhoIFw só será detectado se houver inversão de Rad9. Para Rad9ABC foi previsto um produto de aproximadamente 3,9kb e para Rad9AB, um produto de aproximadamente 2,9kb. (b) Produtos de amplificação detectados apenas nas linhagens induzidas com RAP. DHFR-TS foi utilizado como controle endógeno da reação.

Como ambas proteínas possuem o epítipo de HA fusionados à região C-terminal, a expressão de Rad9 foi analisada tanto com o anticorpo anti-HA (Figura 26a) como com o anticorpo anti-Rad9 (Figura 26b).

A utilização do anticorpo anti-Rad9, permitiu comparar o nível de expressão da proteína fusionada à HA e o nível de expressão de Rad9 endógena. Foi observado uma diminuição dos níveis da proteína WT nas linhagens tratadas com rapamicina (Figura 26c)

Figura 26 – Comparação do nível de expressão de Rad9ABC e Rad9AB

(a) Detecção de Rad9ABC e Rad9AB com anti-HA. A expressão ocorre apenas nas células submetidas à indução por RAP 100nM (+). (b) Os mesmos extratos totais foram sondados com anticorpo anti-Rad9. É possível observar que Rad9ABC tem um tamanho maior do que a proteína endógena (indicada pela seta). Já Rad9AB possui o mesmo tamanho de uma banda presente em todas as amostras, acima dos 55kDa. (c) A normalização dos níveis de Rad9 endógena em relação ao loading GAPDH mostra que nas células induzidas ocorre uma diminuição de 1,80x e 1,14x nos níveis de Rad9 em relação ao controle.

Para avaliar se a expressão de Rad9 a partir do locus ribossômico altera o perfil de crescimento das células, foi feita uma curva de crescimento a partir de um inóculo inicial de 1×10^5 células/mL. A comparação entre linhagem induzida ou não-induzida mostra que o perfil de crescimento não é prejudicado (Figura 27). No Apêndice VIII encontram-se duas curvas adicionais mostrando que mesmo após sucessivos sub-cultivos as células cresceram de maneira semelhante ao seu controle.

Figura 27 – Perfil de crescimento de Rad9ABC e Rad9AB após indução

Perfil de crescimento de linhagens mantidas (círculo preto) ou não (círculo branco) em 100nM de rapamicina. A partir de um inóculo inicial de 1×10^5 céls/mL em todas as linhagens, não foi detectada variação no crescimento das linhagens expostas ao tratamento em relação ao seu controle. Os gráficos estão apresentados em escala linear 10, no Apêndice VI encontram-se as versões em escala logarítmica.

4.2.5. Análise da localização de Rad9 por imunofluorescência

As linhagens diCreRad9ABC^{Lox} e diCreRad9AB^{Lox} foram tratadas com RAP 0nM e 100nM por 48 horas para execução do protocolo de IF. As imagens foram obtidas no microscópio multifoton. Os parâmetros utilizados na aquisição das imagens foram mantidos os mesmos, permitindo a comparação dos níveis das proteínas nas células que foram ou não tratadas com rapamicina.

No programa ImageJ (versão FIJI) o perfil de distribuição de Rad9 foi quantificado, mostrando que Rad9ABC está distribuída principalmente no compartimento nuclear, e que a ausência de uma parte da região C-terminal em Rad9AB compromete a localização da proteína, que se apresenta distribuída também pelo citosol (Figura 28).

Figura 28 – Perfil de distribuição de Rad9ABC e Rad9AB

O perfil de distribuição de ambas proteínas foi analisado por microscopia multifoton. Para cada campo foi gerado o fatiamento do eixo Z, o qual foi reconstruído posteriormente no programa ImageJ/FIJI, com a soma das projeções de cada pixel. A partir do tracejamento feito no DIC, a mesma marcação foi transposta para os canais Hoechst e Alexa[®] 594 (anti-HA), para avaliar a distribuição das proteínas ao longo da célula. Nos gráficos a linha azul indica o sinal de DNA, e a vermelha indica o sinal de Alexa[®] 594. O eixo X mostra a projeção máxima quantificada, e o eixo Y o tamanho do tracejamento em cada célula, em micrometros (μm).

4.2.6. Análise da distribuição de β -tubulina após indução de Rad9

Para avaliar se a expressão aumentada de Rad9 poderia afetar a progressão do ciclo celular das células induzidas, a análise da distribuição de β -tubulina foi analisada, utilizando um anticorpo específico para β -tubulina de *L. major*, que permite a visualização do fuso mitótico intranuclear, podendo então, avaliar a progressão da mitose (AMBIT et al., 2011). As formas mais frequentes da distribuição de tubulina observadas estão indicadas na Figura 29.

Figura 29 – Formas mais frequentes da distribuição de tubulina encontradas ao longo do ciclo celular

Embora diferentes distribuições possam ser encontradas (AMBIT et al., 2011), a título de ilustração estão representadas as formas mais frequentes encontradas nas análises deste trabalho. A primeira, marcada com a estrela branca no Contraste de Interferência Diferencial (DIC), mostram a marcação dos microtúbulos localizados na posição posterior da célula, e denotam células 1N1K1F (um núcleo, um cinetoplasto e um flagelo), que ainda não estão passando por processos mitóticos. No início da mitose, o flagelo começa a ser duplicado e o sinal de β -tubulina concentra-se no núcleo, como na célula marcada com a estrela amarela no DIC. Estas células são 1N^M1K2F, ou seja, possuem um núcleo iniciando ou passando pelo processo de mitose, um cinetoplasto e o segundo flagelo começa a emergir. Já nas células que duplicaram o núcleo e o cinetoplasto, 2N2K2F, mas ainda não efetivamente passaram pelo processo de citocinese, a distribuição de β -tubulina se dá ao longo do eixo longitudinal da célula.

Com base no perfil diferencial de distribuição de β -tubulina, quantificou-se a porcentagem de células que estavam fazendo mitose e a porcentagem que havia completado o processo de divisão, ou seja, já possuíam o material genético duplicado (células pós-mitóticas). A quantificação destas células mostra que embora aumentada nas células induzidas, as porcentagens encontradas não apresentam diferença significativa em relação ao controle não-induzido (Figura 30).

Figura 30 – Porcentagem de células mitóticas e pós-mitóticas em linhagens induzidas ou não

A quantificação mostra leve aumento nas células induzidas com rapamicina (barras laranja e roxa) em relação as células não induzidas (barras cinza). Entretanto, a análise estatística não mostra uma diferença significativa ao comparar a condição induzida e seu controle não-induzido, ou a comparação entre as duas linhagens induzidas (Rad9ABC x Rad9AB).

4.2.7. Efeitos da expressão de Rad9 na progressão do ciclo celular

Para avaliar a progressão durante o ciclo celular, 5×10^4 células/mL foram inoculadas em M199 e induzidas com RAP 100nM por 48 horas. Ao final deste período foi adicionado HU 5mM por 8 horas para sincronização do ciclo. Ao final das 8 horas as células foram lavadas e ressuspensas em meio sem HU, conforme protocolo descrito.

O perfil de progressão das células parece não ser alterado quando Rad9 é mais expressa nas células (Figura 31).

Figura 31 – Perfil de progressão no ciclo celular em células induzidas ou não, após sincronização com HU 5mM

Em cinza estão representadas as linhagens controles não induzidas com rapamicina. Em laranja estão representados os pontos coletados na linhagem diCreRad9ABC^{Lox}. Em roxo estão representados os pontos coletados na linhagem diCreRad9AB^{Lox}. NT indica as células coletadas antes do tratamento com HU, e os pontos de 0 a 12h, indicam as células coletadas após sincronização do ciclo celular com HU por 8 horas.

5. Discussão

Um dos objetivos do desenvolvimento de ferramentas para manipulação genética de parasitos é para o tratamento ou eliminação das infecções que eles causam. Também faz-se uso dessas ferramentas para entender como o sistema imunológico do hospedeiro vertebrado se comporta frente a infecção (BELKAID et al., 2002; OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005; SCHALLIG; OSKAM, 2002). Além disso, podemos manipular geneticamente com o objetivo de entender a biologia desses protozoários.

No protozoário *Leishmania*, os esforços empregados para a geração destes sistemas de manipulação vão desde estabelecimento do sistema de nocaute de genes mediado por recombinação homóloga (CRUZ; COBURN; BEVERLEY, 1991), que apesar da grande utilidade, apresenta limitações, como no caso de estudos de genes essenciais, e também no fenômeno de amplificação gênica observado em algumas das tentativas de nocaute utilizando este método.

Como novas estratégias, que tentam resolver algumas destas limitações, temos i) o sistema CRISPR/Cas9 (SOLLELIS et al., 2015; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2015) estabelecidos com sucesso em *L. major* e *L. donovani*; ii) o sistema induzível por tetraciclina (KUSHNIR et al., 2005) estabelecido em *L. tarentolae*; e iii) a diCre recombinase (DUNCAN et al., 2016) estabelecido em *L. mexicana*.

O sistema mediado pela diCre recombinase apresenta algumas vantagens em relação ao sistema induzível mediado por tetraciclina, notadamente, a necessidade de apenas dois vetores de expressão: um para a recombinase, e outro para o gene de interesse flanqueado pelas sequências Lox. Isso implica no uso de dois marcadores de seleção, ao passo que no sistema induzível por tetraciclina, são necessários três, um para a expressão da T7 polimerase, outro para a expressão do repressor TET, e outro para a expressão do gene de interesse. Com isso, caso haja o interesse em associar qualquer um desses sistemas em linhagens que já possuem outras estratégias de manipulação estabelecidas, como o nocaute por recombinação homóloga, o

sistema diCre apresentará a vantagem de poder dispor de mais uma marca de seleção.

No sistema apresentado neste trabalho, assim como no previamente publicado (DUNCAN et al., 2016), é utilizada a rapamicina como molécula indutora da atividade da recombinase. A rapamicina é uma conhecida inibidora da quinase TOR (*Target of Rapamycin*) (FINGAR; BLENIS, 2004) e em *L. major*, três isoformas desta quinase foram identificadas (MADEIRA DA SILVA; BEVERLEY, 2010).

Uma preocupação importante no estabelecimento desse sistema relaciona-se aos efeitos deletérios que a rapamicina poderia induzir nas linhagens tratadas com essa droga. Na primeira abordagem em *L. mexicana* realizada por Duncan et al. (2015) e no presente trabalho, não foram detectados tais efeitos deletérios (Figuras 13 e 14). Possíveis explicações para isso remontam à quantidade relativamente baixa de droga utilizada, que foi de no máximo 300nM, quando a concentração inibitória IC₅₀ descrita para rapamicina em *L. major* é de 4,9±0,5µM (MADEIRA DA SILVA; BEVERLEY, 2010).

Além disso, o mapeamento dos sítios de ligação necessários para a inibição da quinase TOR por rapamicina em *Leishmania spp.*, mostra que para TOR1 o sítio de ligação à droga encontra-se mutado (S2035Y) em *L. major* e *L. mexicana* (DUNCAN, 2015). Já para TOR2, a presença da droga por um curto período de tempo também já foi demonstrada como uma condição que não inibe TOR2 (MADEIRA DA SILVA; BEVERLEY, 2010). Para TOR3, a quinase mais recentemente descrita em *L. major*, pouco é discutido acerca de sua função e se rapamicina exerce um efeito inibitório sobre ela.

Alternativas visando garantir a menor interferência de rapamicina na indução da recombinase incluem o curto período de tempo em que as culturas ficam na presença da droga e a baixa dosagem utilizada. Além disso, existem esforços para o desenvolvimento de sistemas induzíveis que utilizam drogas semelhantes à rapamicina, chamadas RAPALOGS, que não possuem efeitos inibitórios nas quinases TOR. Estes sistemas são úteis principalmente quando é feito o uso do sistema *in vivo* (JULLIEN et al., 2007).

A utilização do sistema diCre em *L. major* se mostrou bem-sucedido para expressão do gene repórter (GFP). Nas análises da prova de conceito, o uso de concentrações tão baixas quanto RAP 2nM, mostram a expressão de GFP, embora em níveis mais baixos do que quando comparado ao tratamento com RAP 100nM (Figura 16). Assim, mostrou-se que a expressão de GFP é dependente do tempo de indução e da dose de rapamicina utilizados.

Uma possível explicação para a expressão dependente de dose/tempo, está que GFP é uma proteína exógena não essencial à fisiologia e sobrevivência do parasito, e poderia estar sobre um controle transcricional e/ou traducional menos estrito do que outras proteínas.

Uma vez que mostramos a expressão condicional de GFP funcionando corretamente em *L. major*, o próximo passo foi utilizar este sistema para o estudo do domínio C-terminal da proteína Rad9.

Resolvemos utilizar a abordagem com a diCre recombinase porque as tentativas de manipulação de Rad9 por vias clássicas (como por integração via recombinação homóloga) não foram bem-sucedidas. Com o vetor que expressa genes de interesse invertidos e flanqueado por sequências Lox estabelecido no laboratório, Rad9 foi integrada e expressa a partir do locus ribossômico (Figuras 24, 25 e 26) sem que houvesse manipulação no locus endógeno.

A partir da descrição do homólogo de Rad9 em *L. major* (DAMASCENO; NUNES; TOSI, 2013) esta proteína foi analisada visando identificar se as características que são encontradas em outros homólogos, como a presença do domínio C-terminal desestruturado, ou os sítios de fosforilação (Figuras 20 e 21), também estariam presentes em *L. major*. As análises da estrutura da proteína demonstraram diferenças em relação às proteínas homólogas. Notadamente, o tamanho maior de Rad9 de *L. major* quando comparado a outras espécies: 1,83x e 1,68x maior que os homólogos em *H. sapiens* e *S. pombe*, respectivamente.

Foi possível notar que as diferenças observadas entre os diferentes homólogos de Rad9 remontam principalmente a região C-terminal, que é maior em todas as espécies de *Leishmania* analisadas (Figura 20).

A análise da desestruturação intrínseca da região C-terminal de Rad9 norteou a divisão da proteína de *L. major* em três domínios (Figura 22). Para estudo no sistema diCre recombinase foi gerada uma versão truncada da proteína contendo apenas o domínio AB, e uma versão controle, que expressa a proteína inteira a partir do locus ribossômico.

A expressão dessas versões alterou o nível de Rad9 endógena (WT) (Figura 26), dando indícios de que algum tipo de controle pós-transcricional ou pós-traducional possa ocorrer quando o parasito tem uma cópia extra de Rad9 sendo expresso no genoma.

A comparação entre Rad9ABC e Rad9AB mostrou que a região C-terminal parece exercer um papel importante na localização da proteína. Na ausência do domínio C-terminal (Rad9AB), a proteína foi localizada de maneira difusa pelo citoplasma (Figura 28).

Quando foi induzido estresse replicativo com o agente genotóxico HU, que diminui a reserva de nucleotídeos da célula, não foram observadas diferenças na progressão do ciclo celular entre a linhagem expressando Rad9AB e Rad9ABC (Figura 31). Isso pode ser devido ao fato de que essas linhagens ainda expressam Rad9WT, mascarando efeitos decorrentes da ausência do domínio C-terminal em Rad9AB.

Na quantificação de células em mitose ou pós-mitóticas, mostrou-se que na maior expressão de Rad9 (em Rad9AB e Rad9ABC) as células apresentam níveis levemente aumentados de células mitóticas e pós-mitóticas (Figura 30), evidenciando um possível efeito da super-expressão de Rad9 no ciclo celular de *L. major*.

Embora neste trabalho a presença de domínios desestruturados tenha sido apresentado apenas para Rad9, essa característica pode estar presente em outras proteínas. Inclusive, outras funções podem ser desempenhadas por regiões desestruturadas (UVERSKY, 2013). Como exemplos temos a proteína SUMO-1 (*Small Ubiquitin-like MOdifier*), que promove modificações pós-traducionais do tipo sumoilação, e possui um domínio desestruturado importante para sua função. A proteína E-caderina, possui um domínio citoplasmático intrinsecamente desestruturado que se

encontra inacessível quando E-caderina se liga a β -catenina. No caso dessa ligação ser desfeita são expostos motivos de ligação que sinalizam para degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma. (DYSON; WRIGHT, 2005).

Sobre as diferentes funções descritas para a Rad9 discute-se que embora a proteína tenha a capacidade de exercer-las, elas não ocorrem simultaneamente, e muitas podem estar relacionadas com o status de modificação pós-traducional que a proteína está sujeita em determinado momento (LIEBERMAN, 2006). Trabalhos já demonstram que a proteína encontra-se fosforilada em situações fisiológicas normais, mas a hiperfosforilação ocorre ao se induzir danos ao DNA (PARRILLA-CASTELLAR; ARLANDER; KARNITZ, 2004a; ST ONGE et al., 1999; ZOU; CORTEZ; ELLEDGE, 2002), podendo assim demonstrar como uma mesma proteína pode exercer diferentes funções na célula.

Além de estabelecer uma nova ferramenta genética para o protozoário *Leishmania*, o presente trabalho investigou a estrutura e função de Rad9, uma proteína central na sinalização e resposta a danos no DNA neste parasito de importância médica indiscutível. Com isso, novas perspectivas de investigação foram geradas que certamente contribuirão para um melhor entendimento da biologia de Leishmanias e das interações estabelecidas com seus hospedeiros.

6. Conclusões

A partir dos objetivos propostos e das estratégias desenvolvidas nesta dissertação, conclui-se que:

(1) O sistema diCre foi padronizado e otimizado para a expressão condicional de genes em *L. major*. O sistema mostrou-se robusto e adequado ao estudo de genes de interesse do parasito. A utilização do gene repórter GFP poderá nortear a otimização do sistema e a ampliação de suas aplicações.

(2) A geração de linhagens Rad9ABC e Rad9AB foi feita com sucesso, e possibilitou o estudo de características importantes da proteína Rad9 de *L. major*.

(3) O domínio C-terminal de Rad9 participa na localização sub-celular da proteína em *L. major*.

(4) A expressão ectópica de Rad9 correlaciona-se com a modulação dos níveis da proteína endógena.

7. Bibliografia¹

ALBERT, H. et al. Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 7, n. 4, p. 649–59, abr. 1995.

AMBIT, A. et al. Morphological events during the cell cycle of *Leishmania major*. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 11, p. 1429–38, nov. 2011.

ARAKI, K.; YAMAMURA, K. Genetic Manipulations Using Cre and Mutant LoxP Sites. In: [s.l: s.n.]. p. 29–45.

BELKAID, Y. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 502–507, 5 dez. 2002.

BEVERLEY, S. M. Gene Amplification in *Leishmania*. **Annual Review of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 417–444, out. 1991.

BLOM, N. et al. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. **PROTEOMICS**, v. 4, n. 6, p. 1633–1649, jun. 2004.

CANTACESSI, C. et al. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 3, p. 100–108, mar. 2015.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. S7–S16, nov. 2007.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in *Leishmaniasis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 111–126, 1 jan. 2006.

CRUZ, A.; COBURN, C. M.; BEVERLEY, S. M. Double targeted gene replacement for creating null mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 16, p. 7170–4, 15 ago. 1991.

DAMASCENO, J. D. **Caracterização molecular do envolvimento das proteínas LmHus1 e LmRad9 em mecanismos de reconhecimento e reparo de DNA no parasito *Leishmania major***. Ribeirão Preto: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 6 fev. 2013.

DAMASCENO, J. D. et al. Functional compartmentalization of Rad9 and Hus1 reveals diverse assembly of the 911 complex components during the DNA damage response in *Leishmania*. **Molecular Microbiology**, v. 101, n. 6, p. 1054–1068, set. 2016.

DAMASCENO, J. D.; NUNES, V. S.; TOSI, L. R. O. LmHus1 is required for the

¹ As referências apresentadas nesta dissertação estão de acordo com a ABNT NBR 6023 (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2002a) e seguem o sistema autor-data.

DNA damage response in *Leishmania major* and forms a complex with an unusual Rad9 homologue. **Molecular Microbiology**, v. 90, n. 5, p. 1074–1087, dez. 2013.

DELACROIX, S. et al. The Rad9-Hus1-Rad1 (911) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. **Genes & development**, v. 21, n. 12, p. 1472–7, 15 jun. 2007.

DORÉ, A. S. et al. Crystal Structure of the Rad9-Rad1-Hus1 DNA Damage Checkpoint Complex—Implications for Clamp Loading and Regulation. **Molecular Cell**, v. 34, n. 6, p. 735–745, 26 jun. 2009.

DOSZTANYI, Z. et al. IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3433–3434, 15 ago. 2005.

DOSZTÁNYI, Z. et al. The Pairwise Energy Content Estimated from Amino Acid Composition Discriminates between Folded and Intrinsically Unstructured Proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 347, n. 4, p. 827–839, 8 abr. 2005.

DUNCAN, S. M. **Development of an inducible system for Leishmania gene deletion: application to the cell cycle protein kinase CRK3**. [s.l.] University of Glasgow, 2015.

DUNCAN, S. M. et al. Conditional gene deletion with DiCre demonstrates an essential role for CRK3 in *Leishmania mexicana* cell cycle regulation. **Molecular Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 931–944, jun. 2016.

DYSON, H. J.; WRIGHT, P. E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 3, p. 197–208, mar. 2005.

FINGAR, D. C.; BLENIS, J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. **Oncogene**, v. 23, n. 18, p. 3151–3171, 19 abr. 2004.

FURUYA, K. et al. Chk1 activation requires Rad9 S/TQ-site phosphorylation to promote association with C-terminal BRCT domains of Rad4TOPBP1. **Genes & development**, v. 18, n. 10, p. 1154–64, 15 maio 2004.

GENOIS, M.-M. et al. DNA repair pathways in trypanosomatids: from DNA repair to drug resistance. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 78, n. 1, p. 40–73, mar. 2014.

HANDMAN, E. et al. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 229–243, 1 abr. 2001.

HENDERSON, D. M. et al. Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian *mdr1* gene. **Molecular and cellular biology**, v. 12, n. 6, p. 2855–65, jun. 1992.

ISHIKAWA, K.; ISHII, H.; SAITO, T. DNA Damage-Dependent Cell Cycle Checkpoints and Genomic Stability. **DNA and Cell Biology**, v. 25, n. 7, p. 406–411, jul. 2006.

IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*.

Science (New York, N.Y.), v. 309, n. 5733, p. 436–42, 15 jul. 2005.

JULLIEN, N. et al. Regulation of Cre recombinase by ligand-induced complementation of inactive fragments. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 21, p. e131, 1 nov. 2003.

JULLIEN, N. et al. Conditional transgenesis using Dimerizable Cre (DiCre). **PloS one**, v. 2, n. 12, p. e1355, 26 dez. 2007.

KEDZIERSKI, L. et al. Leishmaniasis: Current Treatment and Prospects for New Drugs and Vaccines. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 599–614, 1 fev. 2009.

KELLEY, L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 7 maio 2015.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, jul. 2015.

KRAEVA, N. et al. **Tetracycline-inducible gene expression system in Leishmania mexicana** *Molecular and Biochemical Parasitology*. [s.l.: s.n.].

KUSHNIR, S. et al. Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host Leishmania tarentolae. **Protein Expression and Purification**, v. 42, n. 1, p. 37–46, 2005.

LAFFITTE, M.-C. N. et al. Plasticity of the Leishmania genome leading to gene copy number variations and drug resistance. **F1000Research**, v. 5, p. 2350, 2016.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274–293, 2012.

LEBOWITZ, J. H. et al. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in Leishmania. **Genes & development**, v. 7, n. 6, p. 996–1007, jun. 1993.

LIEBERMAN, H. B. Rad9, an evolutionarily conserved gene with multiple functions for preserving genomic Integrity. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 97, n. 4, p. 690–697, 1 mar. 2006.

MADEIRA DA SILVA, L.; BEVERLEY, S. M. Expansion of the target of rapamycin (TOR) kinase family and function in Leishmania shows that TOR3 is required for acidocalcisome biogenesis and animal infectivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 26, p. 11965–70, 29 jun. 2010.

NAGY, A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. **Genesis (New York, N.Y. : 2000)**, v. 26, n. 2, p. 99–109, fev. 2000.

NAVADGI-PATIL, V. M.; BURGERS, P. M. A tale of two tails: Activation of DNA damage checkpoint kinase Mec1/ATR by the 911 clamp and by Dpb11/TopBP1. **DNA Repair**, v. 8, n. 9, p. 996–1003, 2009a.

NAVADGI-PATIL, V. M.; BURGERS, P. M. The unstructured C-terminal tail of the 911 clamp subunit Ddc1 activates Mec1/ATR via two distinct mechanisms. **Molecular cell**, v. 36, n. 5, p. 743–53, 11 dez. 2009b.

NIIDA, H.; NAKANISHI, M. DNA damage checkpoints in mammals.

Mutagenesis, v. 21, n. 1, p. 3–9, 27 set. 2005.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 2, p. 293–305, abr. 2005.

PARRILLA-CASTELLAR, E. R.; ARLANDER, S. J. H.; KARNITZ, L. Dial 9–1–1 for DNA damage: the Rad9–Hus1–Rad1 (9–1–1) clamp complex. **DNA Repair**, v. 3, n. 8, p. 1009–1014, 2004a.

PARRILLA-CASTELLAR, E. R.; ARLANDER, S. J. H.; KARNITZ, L. Dial 9–1–1 for DNA damage: the Rad9–Hus1–Rad1 (9–1–1) clamp complex. **DNA Repair**, v. 3, n. 8–9, p. 1009–1014, ago. 2004b.

PASSOS-SILVA, D. G. et al. Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. **Journal of nucleic acids**, v. 2010, p. 840768, 4 out. 2010.

Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase. Disponível em:

<<https://www.neb.com/products/m0530-phusion-high-fidelity-dna-polymerase>>.

RAN, F. A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, p. 2281–2308, 24 out. 2013.

ROOS-MATTJUS, P. et al. Phosphorylation of human Rad9 is required for genotoxin-activated checkpoint signaling. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 27, p. 24428–37, 4 jul. 2003.

SANTOS, D. O. et al. Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 1–10, 4 jun. 2008.

SCHALLIG, H. D. F. H.; OSKAM, L. Review: Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Tropical Medicine and International Health**, v. 7, n. 8, p. 641–651, ago. 2002.

SHIOTANI, B.; ZOU, L. ATR signaling at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 3, 2009.

SOHN, S. Y.; CHO, Y. Crystal Structure of the Human Rad9–Hus1–Rad1 Clamp. **Journal of Molecular Biology**, v. 390, n. 3, p. 490–502, 17 jul. 2009.

SOLLELIS, L. et al. First efficient CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania* parasites. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 10, p. 1405–1412, out. 2015.

SPÄTH, G. F.; CLOS, J. Joining forces: first application of a rapamycin-induced dimerizable Cre system for conditional null mutant analysis in *Leishmania*. **Molecular Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 923–927, jun. 2016.

ST ONGE, R. P. et al. The human G2 checkpoint control protein hRAD9 is a nuclear phosphoprotein that forms complexes with hRAD1 and hHUS1. **Molecular biology of the cell**, v. 10, n. 6, p. 1985–95, jun. 1999.

STILES, J. K. et al. Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v.

93, n. 8, p. 781–807, dez. 1999.

SVÄRD, S.; TROELL, K. Synchronization of Pathogenic Protozoans. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l.: s.n.]. v. 1524p. 243–252.

Taq DNA Polymerase, recombinant (5 U/μL). Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EP0402>>.

UBEDA, J.-M. et al. Modulation of gene expression in drug resistant Leishmania is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. **Genome Biology**, v. 9, n. 7, p. R115, 2008.

UEDA, S. et al. Two serine phosphorylation sites in the C-terminus of Rad9 are critical for 911 binding to TopBP1 and activation of the DNA damage checkpoint response in HeLa cells. **Genes to Cells**, v. 17, n. 10, p. 807–816, out. 2012.

ULLU, E.; TSCHUDI, C.; CHAKRABORTY, T. RNA interference in protozoan parasites. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 509–519, 15 abr. 2004.

UVERSKY, V. N. The most important thing is the tail: Multitudinous functionalities of intrinsically disordered protein termini. **FEBS Letters**, v. 587, n. 13, p. 1891–1901, 27 jun. 2013.

VOZIYANOV, Y.; PATHANIA, S.; JAYARAM, M. A general model for site-specific recombination by the integrase family recombinases. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 4, p. 930–41, 15 fev. 1999.

WHO | Leishmaniasis. **WHO**, 2016.

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR Signaling in Growth and Metabolism. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 471–484, 2006.

ZHAN, Z. et al. Phosphorylation of Rad9 at Serine 328 by Cyclin A-Cdk2 Triggers Apoptosis via Interfering Bcl-xL. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e44923, 13 set. 2012.

ZHANG, W.-W.; MATLASHEWSKI, G. CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in Leishmania donovani. **mBio**, v. 6, n. 4, p. e00861, 21 jul. 2015.

ZOU, L.; CORTEZ, D.; ELLEDGE, S. J. Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. **Genes & development**, v. 16, n. 2, p. 198–208, 15 jan. 2002.

8. Apêndices

I – Dispensa de parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

Ribeirão Preto, 19 de novembro de 2015.

Prezados,

O projeto "Caracterização do domínio C-terminal da proteína LmRad9 de *Leishmania major* envolvida na resposta a danos no DNA", sob orientação do Prof. Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi, em desenvolvimento no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) utiliza como modelo de estudo o protozoário parasito *Leishmania major*. O projeto utiliza como principais metodologias ferramentas clássicas de biologia celular e molecular disponíveis no laboratório visando a modificação estrutural da proteína LmRad9 e analisar os efeitos dessas modificações da proteína na resposta ao dano ao DNA e no funcionamento do complexo 9-1-1 (informações adicionais no resumo em anexo), a qual já se tem conhecimento da participação de LmRad9.

Visando o cumprimento do Regulamento do Programa de Pós-graduação, venho por meio desta verificar se o projeto em questão necessita da apreciação deste Comitê de Ética em Pesquisa, uma vez que no presente estudo não são utilizados materiais biológicos providos de seres humanos ou animais, nem da utilização destes como objeto de estudo.

Atenciosamente,

Renato Elias R.S. Santos
Renato Elias Rodrigues de Souza Santos
Nº USP 9384367

renatorodrigues@usp.br

Laboratório Biologia Molecular de Leishmanias, ramal 3159
Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes patogênicos
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP

DR.ª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
HCRP-USP e FMRP-USP

*Não há necessidade de submissão
ao Comitê de Ética em Pesquisa
23/11/2015 Marcia Villanova*

II – Informações dos oligonucleotídeos utilizados no estudo

Oligonucleotídeo	Ta (°C)	Sequência (5'→3')	Alvo
OL2380	62,1	CATTCCGTGCGAAAGCCGG	Diagnóstico de integração no rRNA
OL4355	55,5	GATGGTTTCCACCTGCAC	BLA reverso
OL15	63,8	CCGTGGGCTTGTACTCGGTCA	PAC reverso
HAFwNheIMCSHA	62,1	ATTGCTAGCATTAGATCTATTCATATGATTCCTGCAGGGCGGTGTTCTAGATACCCCTACG	Amplificação de TAG HA e SMC
HARvKpnI	64,8	ATTGGTACCCTAGCGTGGATCTGGATCCTTACCTTGAGG	
GFPa	59,7	CTCGCCCTTGCTCACCAT	Diagnóstico de inversão e integração de GFP ^{Lox}
GFPb	60,2	GGCATGGACGAGCTGTACAAG	
Rad9BgIIIFw	55,7	ATTAGATCTATGTCACTCCAATTCACAGTGAG	Clonagem e diagnóstico de integração de LmRad9
Rad9ABNdeIRv	63,3	ATTCATATGCTATGGCAGCGGAATGAAGCCGGCTG	
Rad9ABCNdeIRv	65,3	ATTCATATGCTAGTTCTGCGTCGGCCCTCGCGACAT	
Rad9XhoIFw	56,6	ATGGGCAAAACATTCGATGTGAA	

Fonte: O autor, 2017.

III – Protocolos de WB para cada anticorpo utilizado no estudo

Etapa	HA	Rad9	EF1α	GAPDH
Bloqueio	Leite desnatado 10% (p/v)			
Anticorpo primário	1:1000	1:3000	1:20.000	1:15000
	1 hora	2 horas	2 horas	1 hora
	PBS-T 0,05%	PBS-T 0,05%	PBS-T 0,05%	PBS-T 0,05%
	Leite 3% (p/v)	Leite 3% (p/v)	Leite 3% (p/v)	Leite 3% (p/v)
Lavagens	4 lavagens, 5 min cada, PBS-T 0,05%			
Anticorpo secundário	1:10.000		1:25.000	
	anti- <i>camundongo</i>		anti- <i>coelho</i>	
	40 min		40 min	
	PBS-T 0,05%		PBS-T 0,05%	
	Leite 3% (p/v)		Leite 3% (p/v)	
Lavagens	4 lavagens, 5 min cada, PBS-T 0,05%			
Revelação	Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare)			

Fonte: O autor, 2017.

IV – Mapa do vetor pGL2332, contendo GFP^{Lox}

O vetor pGL2332 contém sequências regulatórias necessárias para a expressão adequada, como uma origem de replicação em bactérias (ORI), e a marca de resistência à ampicilina (AMP). Para a expressão em *Leishmania*, o vetor possui as sequências de homologia necessárias para integração no gene 18S do locus ribossômico (5rRNA18S e 3rRNA18S), o sítio acceptor do *splicing leader* (pXSL), a sequência acceptora de poliadenilação (PAS), além do gene de GFP com o epítipo HA invertidos em relação ao sentido de transcrição do locus ribossômico. As sequências Lox66 e Lox77 estão flanqueando o gene de interesse para que a inversão seja mediada pela recombinase.

V – Vetores utilizados para geração de pGL2332-C

O vetor pGL631-6xHA contém uma origem de replicação para bactéria (ORI) e a marca de resistência à ampicilina (AMP). Ao digeri-lo com as enzimas Pacl (posição 406) e PmeI (posição 5690), é liberado um fragmento de aproximadamente 5,2kb contendo as regiões de homologia para integração no gene 18S do locus ribossômico (5'18SrRNA e 3'18SrRNA), um sítio aceitor de *splicing leader* (pXSL), o epítipo de HA, o sítio aceitor de poliadenilação (PAS) e a marca de seleção a purimicina (PAC). Este vetor foi utilizado apenas para amplificação por PCR do epítipo 6xHA, utilizando um par de oligonucleotídeos contendo um sítio múltiplo de clonagem e sítios de enzimas para direcionar a ligação no vetor pGL2332.

O vetor pGL2332 foi digerido com as enzimas KpnI e NheI, com o objetivo de liberar o fragmento de 913bp entre as posições 930 e 1842bp. No lugar deste fragmento, foi incluído o produto de PCR do vetor pGL631-6xHA digerido com estas mesmas enzimas, gerando o vetor pGL2332-C. Os clones utilizados foram analisados por digestão enzimática e sequenciamento. Os componentes do vetor são: a marca de resistência à ampicilina (AMP), origem de replicação para bactérias (ORI), sequências de homologia para integração no locus ribossômico (5rRNA18S e 3rRNA18S), as sequências Lox66 e Lox77, flanqueando GFP em fusão a 6xHA, e que serão reconhecidas pela recombinase; o sítio aceptor de *splicing* (pXSL) e o de poliadenilação (PAS), e a marca de seleção puromicina (PAC).

O vetor pGL2332-C resultante da clonagem de 6xHA no vetor pGL2332 previamente digerido com NheI e KpnI contém as mesmas características descritas para o vetor pGL2332, exceto a presença de GFP, e incluindo a SMC com as enzimas SdaI, NdeI, BglII e NheI. Ao digerir com as enzimas PacI e PmeI, obtém-se um fragmento para integração no locus ribossômico de *Leishmania spp.*

VI – Representação gráfica em escala logarítmica das curvas de crescimento apresentadas no trabalho

Figura 15 – Perfil de crescimento de diferentes linhagens após tratamento com rapamicina

Figura 29 - Perfil de crescimento de Rad9ABC e Rad9AB após indução

VII – Representação esquemática da clonagem de Rad9ABC e Rad9AB no vetor pGL2332-C

Este vetor contém os sítios de *PacI* e *PmeI* que foram utilizados para gerar os fragmentos de transfecção com 6,5 e 7,5kb para Rad9AB e Rad9ABC, respectivamente. Assim como nos outros vetores descritos neste trabalho, o fragmento resultante possui as sequências necessárias para integração e expressão em *L. major*. As regiões 5rRNA 18S e 3rRNA 18S foram utilizadas para integração no locus ribossômico, pXSL representa o sítio aceptor do *splicing leader*, PAC representa o gene de resistência a puromicina, PAS o sítio aceptor de poliadenilação. AB e ABC representam as versões de Rad9, 6xHA o epítipo em fusão C-terminal, e Lox66/Lox77 as sequências necessárias para inversão mediada pela Cre recombinase.

VIII – Perfil de crescimento de diCreRad9ABC^{Lox} e diCreRad9AB^{Lox} após sub-cultivos

As células foram mantidas (círculo preto) ou não (círculo branco) em RAP 100nM durante o período indicado de tempo. Na transição entre o quarto e quinto dia, cada cultura foi diluída em novo meio, com inóculo de 1.10^5 células/mL e o crescimento acompanhado por mais quatro dias. O par de gráficos superior mostram os dados em escala linear, e o par de gráficos inferior mostram os mesmos dados em escala logarítmica.