

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR
E MOLECULAR**

**CLONAGEM, SEQUENCIAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE
CODIFICA A ENZIMA DNA TOPOISOMERASE DO TIPO II DO PROTOZOÁRIO
Blastocrithidia culicis (BRUESKE, 1967)**

CURITIBA

2005

ÉDIO ELIGIO LOURENÇO

**CLONAGEM, SEQUENCIAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE
CODIFICA A ENZIMA DNA TOPOISOMERASE DO TIPO II DO PROTOZOÁRIO**

Blastocrithidia culicis (BRUESKE, 1967)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, Coordenação de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná

Orientador: Dr. Stenio Perdigão Fragoso

CURITIBA

2005

Este trabalho é dedicado

Aos meus tios Amilton e Raquel e aos meus primos Alexandre, André e Dayane

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Stenio Perdigão Fragoso por seus valiosos ensinamentos, pela confiança depositada em mim, pelo carinho e amizade.

Ao Dr. Samuel Goldenberg, Dr. Marco A. Kriger e Dr. Cláudia N. D. dos Santos pelo grande incentivo e ensinamentos.

A Dr. Cristina Motta por seus ensinamentos, pelo incentivo, por estar sempre disposta a ajudar e por sua amizade.

Gisele Fernanda Assine Picchi pelos ensinamentos, amizade e colaboração na realização do trabalho.

Danielle P. Cavalcanti por sua simpatia, alto astral e colaboração com a parte de biologia celular do trabalho.

Nilson José Fidêncio, Cassiano Lis Barroso, Tatiana dos Passos, pela amizade e apoio técnico.

A todos os colegas do Instituto de Biologia Molecular do Paraná pelo apoio e amizade.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná por seus ensinamentos e incentivo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
RESUMO.....	I
ABSTRACT	I
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS GERAIS DA TOPOISOMERASES.....	1
1.2 TOPOISOMERASES DO TIPO IA	3
1.4 TOPOISOMERASES DO TIPO II.....	5
1.4.1 DNA Topoisomerases do tipo IIA	5
1.4.1.1 Como atuam as topoisomerases do tipo IIA.....	7
1.4.2 Topoisomerases do tipo IIB.....	9
1.4.2.1 Como atuam as topoisomerases do tipo IIB.....	9
1.5 O PAPEL DAS TOPOISOMERASES EM PROCESSOS BIOLÓGICOS	10
1.5.1 Topoisomerases na replicação	10
1.5.2 Topoisomerases na transcrição	11
1.5.3 Topoisomerases na recombinação	13
1.6 INIBIDORES DE TOPOISOMERASES.....	14
1.7 ESTUDO DAS TOPOISOMERASES EM TRIPANOSOMATÍDEOS.....	16
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.1.1 Objetivos específicos.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 MICRORGANISMOS	21

3.2 PLASMÍDEOS E VETORES DERIVADOS DE BACTERIÓFAGOS	21
3.3 MARCADORES DE PESO MOLECULAR PARA GÊIS.....	21
3.4 NUCLEOTÍDEO MARCADO RADIOATIVAMENTE	22
3.5 MEIOS DE CULTURA.....	22
3.6 SOLUÇÕES.....	22
3.7 CULTIVO CELULAR.....	25
3.8 ISOLAMENTO DO DNA TOTAL DE <i>B. culicis</i>	25
3.9 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DE <i>B.culicis</i>	25
3.10 PREPARAÇÃO DE VETORES	26
3.11 LIGAÇÃO.....	27
3.12 PREPARAÇÃO DE <i>E. coli</i> CÁLCIO-COMPETENTE.....	27
3.13 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS CÁLCIO-COMPETENTES	28
3.14 ANÁLISE DE CLONES PELA TÉCNICA DE PALITAGEM.....	28
3.15 PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO EM PEQUENA ESCALA (MINIPREP).....	28
3.16 CONSTRUÇÃO DE INICIADORES PARA DOMÍNIOS CONSERVADOS ENTRE TOPO II DE TRIPANOSOMATÍDEOS.	29
3.17 CLONAGEM DE FRAGMENTOS DO GENE <i>BcTOP2</i>	30
3.18 CLONAGEM DO FRAGMENTO DE DNA BC7-14 AMPLIFICADO DE PCR	31
3.18.1 Sub-clonagem do fragmento de DNA Bc7-14.....	31
3.19 VARREDURA DA BIBLIOTECA GENÔMICA DE <i>B.culicis</i> PARA OBTENÇÃO DO GENE <i>BcTOP2</i>	32
3.19.1 Construção de biblioteca genômica de <i>B. culicis</i>	32
3.19.2 Seleção dos clones da biblioteca genômica de <i>B. culicis</i> contendo sequências do gene <i>BcTOP2</i>	33
3.20 CLONAGEM DO GENE <i>BcTOP2</i> A PARTIR DE UM CLONE GENÔMICO	34
3.20.1 Clonagem dos fragmentos obtidos da digestão do DNA do clone genômico com as enzimas <i>XcmI</i> e <i>SacI</i>	34
3.21 SEQUÊNCIAMENTO DO GENE <i>BcTOP2</i>	35
3.22 ANÁLISES COMPUTACIONAIS.....	36
3.23 CARACTERIZAÇÃO DO GENE <i>BcTOP2</i> POR <i>SOUTHERN BLOT</i>	36
3.24 ANÁLISES DA EXPRESSÃO DO GENE <i>BcTOP2</i> POR <i>NOTHERN BLOT</i>	37

3.25 EXPRESSÃO DA REGIÃO CARBOXI-TERMINAL DE BcTOPOII FUSIONADA A GFP	37
3.25.1 Indução da expressão da região carboxi-terminal de BcTOPOII fusionada a GFP	38
3.25.2 Purificação da proteína de fusão GFPCTOP	39
3.26 EXPRESSÃO DA REGIÃO CODIFICANTE DO GENE <i>BcTOP2</i> EM <i>E.coli</i>	39
3.27 OBTENÇÃO DE ANTISORO POLICLONAL CONTRA BcTOPOII	40
3.28 ESTUDO DA EXPRESSÃO DE TOPOII POR WESTERN BLOT	40
3.29 LOCALIZAÇÃO CELULAR DA TOPOII DE <i>B.culicis</i>	41
3.29.1 Imunolocalização por microscopia óptica	41
3.29.2 Imunolocalização de BcTOPOII por microscopia eletrônica de transmissão.....	42
3.29.2.1 Processamento de <i>B.culicis</i> para imunocitoquímica	42
3.29.2.2 Imunocitoquímica para microscopia eletrônica.....	42
4 RESULTADOS	43
4.1 ISOLAMENTO DO GENE <i>BcTOP2</i>	43
4.2 ANÁLISE DO GENE <i>BcTOP2</i> POR <i>SOUTHERN BLOT</i>	49
4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>BcTOP2</i> POR <i>NORTHER BLOT</i>	51
4.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DO GENE <i>BcTOP2</i>	52
4.5 ANÁLISE COMPARATIVA DA TOPOII DE <i>B. culicis</i> COM OUTRAS TOPOII EUCARIÓTICAS.....	53
4.6 EXPRESSÃO DE UM FRAGMENTO DO GENE <i>BcTOP2</i> E PRODUÇÃO DE ANTI-SORO CONTRA A TOPOISOMERASE II DE <i>B. culicis</i>	57
4.7 EXPRESSÃO DO GENE <i>BcTOP2</i> EM <i>E.coli</i>	59
4.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TOPOII POR WESTERN BLOT.....	60
4.9 LOCALIZAÇÃO CELULAR	61
5 DISCUSSÃO	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 REAÇÕES CATALISADAS POR DNA TOPOISOMERASES	3
FIGURA 2 ESQUEMA REPRESENTATIVO DE COMPARAÇÃO ENTRE TOPOII	7
FIGURA 3 MECANISMO DE AÇÃO PROPOSTO PARA AS TOPOISOMERASES TIPO IIA	8
FIGURA 4 PROBLEMAS TOPOLÓGICOS ASSOCIADOS COM A ENLONGAÇÃO DA FORQUILHA DE REPLICAÇÃO	10
FIGURA 5 RESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRATÉGIA DE SEQÜENCIAMENTO DO GENE <i>BcTOP2</i>	46
FIGURA 6 SEQUENCIA DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS DO GENE <i>BcTOP2</i>	47
FIGURA 7 ANÁLISE DA ORGANIZAÇÃO DO GENE <i>BcTOP2</i> POR ENSAIO DO TIPO <i>SOUTHERN BLOT</i> .	50
FIGURA 8 MAPA DE RESTRIÇÃO DO GENE <i>BcTOP2</i>	50
FIGURA 9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>BcTOP2</i> POR <i>NORTHER BLOT</i>	51
FIGURA 10 COMPARAÇÃO DE <i>BcTOPOII</i> COM AS SUBUNIDADES DA DNA GIRASE DE <i>E.coli</i>	52
FIGURA 11 ALINHAMENTO MULTIPLO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE TOPOII	54
FIGURA 12 EXPRESSÃO DE UM FRAGMENTO DO GENE <i>BcTOP2</i>	58
FIGURA 13 EXPRESSÃO DO GENE <i>BcTOP2</i> EM <i>E.coli</i>	59
FIGURA 14 ANALISE DA EXPRESSÃO DE TOPOII POR WESTERN BLOT	60
FIGURA 15 - IMUNOLocalização DE <i>BcTOPOII</i> POR MICROSCOPIA ÓPTICA	61
FIGURA 16 LOCALIZAÇÃO CELULAR DE <i>BcTOPOII</i> POR IMUNOCITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL.	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 SUBFAMILIAS DAS DNA TOPOISOMERASES	2
TABELA 2 ENZIMAS E TAMPÕES DAS ENZIMAS	24
TABELA 3 INICIADORES PARA DOMÍNIOS ENTRE TOPOII DE TRIPANOSOMATÍDEOS	29
TABELA 4 PARES DE INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR	30
TABELA 5 INICIADORES UTILIZADOS NO SEQUENCIAMENTO	35
TABELA 6 PORCENTAGEM DE HOMOLOGIA ENTRE TOPOISOMERASES II EUCARIÓTICAS	53

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>BcTOP2</i>	Gene que codifica a DNA topoisomerase do tipo II de <i>Blastocrithidia culicis</i>
BcTOPOII	DNA topoisomerase do tipo II de <i>Blastocrithidia culicis</i>
BCIP	5-Bromo-4cloro-3-indolil fosfato
BSA	Albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
Ci	Curie
CIP	Fosfatase alcalina de intestino de bezerro
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
FITC	Isotilcianato de flureceina
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HEPES	(N-[2-hidroxietyl] piperazino N'-[2-ácido etanosulfonico
IPTG	Isopropil-β-D-tio-galactopiranosídeo
kDNA	DNA de cinetoplasto
kDa	Quilo Dalton
Kpb	1000 pares de nucleotídeos
Kb	1000 nucleotídeos
MOPS	Ácido 3-(N-morfolina)propanosulfônico
mRNA	RNA mensageiro
NBT	Nitroblue tetrazol
NP-40	Detergente nonidet P-40
PBS	Tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Poliétilenoglicol
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliácridamida contendo SDS
SSC	Tampão salina-citrato
<i>TcTOP2</i>	Gene que codifica a DNA topoisomerase do tipo II do <i>Trypanosoma cruzi</i>
TcTOPOII	DNA topoisomerase do tipo II do <i>Trypanosoma cruzi</i>
topoII	DNA topoisomerase do tipo II
X-gal	5 bromo-4-cloro-3 indol-β-D-galactosídeo

RESUMO

DNA topoisomerasas são enzimas que participam de diversos processos celulares tais como replicação, transcrição, recombinação e segregação dos cromossomos. Tais enzimas atuam clivando transitoriamente uma fita (topoisomerasas do tipo I) ou ambas (topoisomerasas do tipo II) as fitas da molécula de DNA. As topoisomerasas são alvos de agentes bactericidas e de drogas anti-tumorais e podem vir a ser um importante alvo para quimioterapia de doenças causadas por parasitas. Neste trabalho nós clonamos e caracterizamos o gene que codifica a enzima topo II do tripanosomatídeo monoxênico *Blastocrithidia culicis* (*BcTOP2*), uma vez que, esta enzima pode vir a ser usada como protótipo para topoisomerasas de tripanosomatídeos patogênicos e conseqüentemente um excelente modelo para estudos funcionais e estruturais. O gene *BcTOP2* apresentou um quadro aberto de leitura com 3,693 pares de bases, codificando um polipeptídeo de 1.230 aminoácidos com uma massa molecular estimada de 138kDa. A seqüência de aminoácidos da topo II de *B. culicis* apresenta uma alta similaridade com topoisomerasas de outros tripanosomatídeos, tais como *C. fasciculata* (81.0%), *L. infantum* (79.0%), *Trypanosoma cruzi* (76.0%) e *Trypanosoma brucei* (74.0%). Bctopo II apresenta uma menor similaridade com a topo II humana (48.0%). *BcTOP2* é um gene de cópia única no genoma de *B. culicis* e transcreve um mRNA de 4.5 kb. O antisoro produzido em coelho contra a porção carboxi-terminal de Bctopo II fusionada a GFP detectou, por imunoblot, uma banda com aproximadamente 138 kDa em extratos celulares de *B. culicis*, que é compatível com a massa do polipeptídeo, cuja seqüência foi deduzida a partir do gene *BcTOP2*. Ensaios de imunolocalização mostraram que o antisoro reconhece uma TOPOII nuclear.

ABSTRACT

DNA topoisomerases are involved in cellular processes as diverse as replication, transcription, recombination and chromosome segregation. Such enzymes act by transiently cutting one (type I) or both (type II) strands of the DNA. DNA topoisomerases are inhibited by antimicrobial and antitumoral agents and might be also important targets in the chemotherapy of diseases caused by parasites. We have cloned and characterized the gene encoding the topoisomerase II from the monoxenic trypanosomatid *B. culicis* (*BcTOP2*), since this enzyme might be used as a prototype for topoisomerase II enzymes from pathogenic trypanosomatids and consequently a good model for structural and functional studies. The *BcTOP2* gene revealed an open reading frame of 3,693 base pairs predicting a protein with 1,230 amino acids and an estimated molecular weight of 138 kDa. The *B. culicis* topoisomerase II amino acid sequence shares high similarity with topoisomerases from other trypanosomatids, such as *C. fasciculata* (81.0%), *L. infantum* (79.0%), *Trypanosoma cruzi* (76.0%) and *Trypanosoma brucei* (74.0%). *BcTOP2* shares a lower similarity with the human homologs topoisomerase II (48.0%). *BcTOP2* is a single copy gene in the genome of *B. culicis* and encodes a 4.5-kb mRNA. Antiserum raised against a C-terminal portion of *BcTOP2* fused to GFP could detect a band of 138 kDa in immunoblot, the expected size of the polypeptide deduced from the *BcTOP2* gene. Immunolocalisation assays showed that the antiserum recognized the nuclear TOPOII.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA TOPOISOMERASES

As DNA Topoisomerasas são enzimas que catalisam mudanças na topologia da molécula de DNA, alterando o número de vezes que as fitas do DNA se entrelaçam entre si (DNA duplex) e no espaço (super-enovelamento). A molécula de DNA in vivo apresenta-se geralmente como uma estrutura fechada, tal como as moléculas de DNA circulares (plasmídeos e genomas de alguns vírus) ou como no genoma de bactérias e organismos eucarióticos, onde assume forma de grandes alças, cujas extremidades são fixadas por macromoléculas e, portanto, impedidas de girar sobre o eixo da própria hélice. Essa organização é importante porque permite o aparecimento de uma nova estrutura conformacional na molécula de DNA, o super-enovelamento.

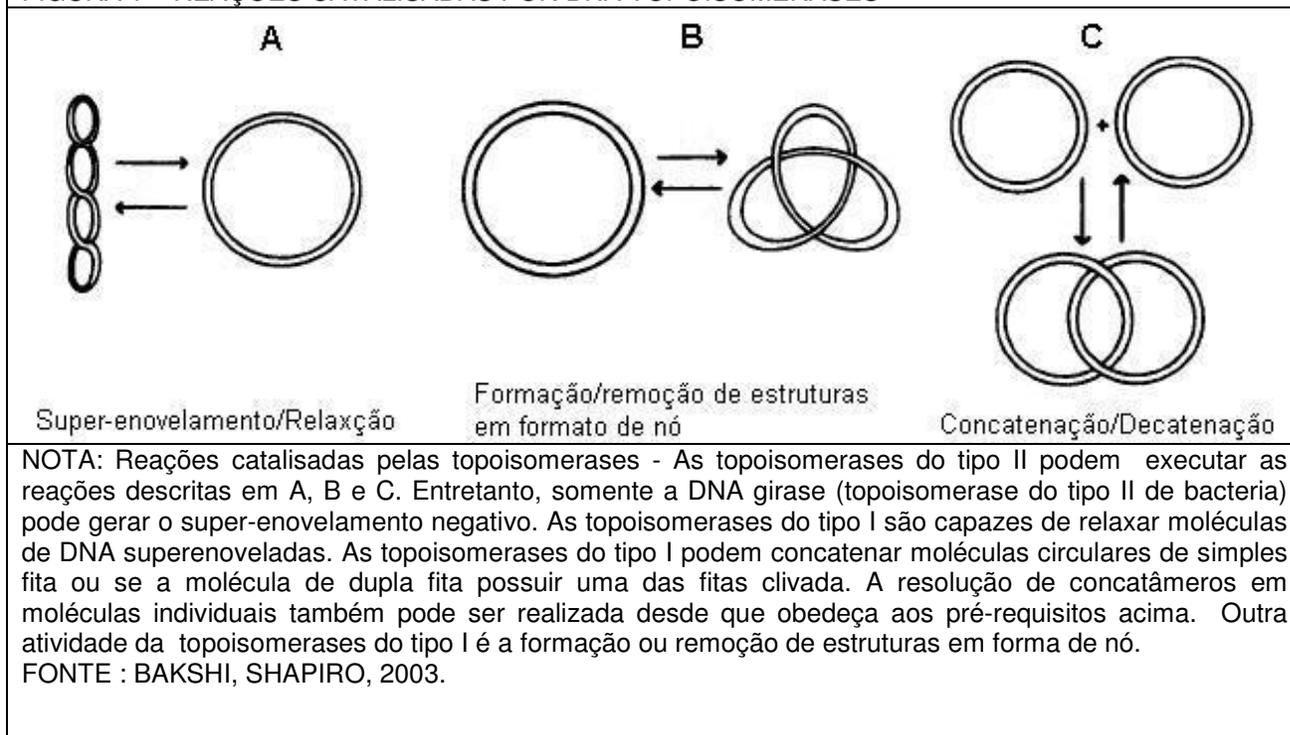
As topoisomerasas catalisam a isomerização topológica do DNA através da quebra transitória de uma ou ambas as fitas da molécula. A partir desta distinção, surgem respectivamente duas categorias de topoisomerasas as do tipo I e as do tipo II (VOSBERG, 1985; WANG, 1996). A quebra do DNA pelas topoisomerasas é acompanhada pela formação de uma ligação fosfodiéster transiente entre um resíduo de tirosina específico da proteína e uma das extremidades da fita clivada. As topoisomerasas do tipo I, no curso da reação clivam apenas uma das fitas do DNA e são divididas em 2 subfamílias: A subfamília IA e a subfamília IB. As topoisomerasas IA se ligam ao terminal 5' fosfato do corte no DNA, enquanto que as topoisomerasas IB se ligam ao terminal 3' fosfato do corte do DNA (WANG, 1971; WANG, 1996) (TABELA 1).

As topoisomerasas que clivam ambas as fitas são agrupadas na família do tipo II e podem ser classificadas segundo sua estrutura nas subfamílias IIA e IIB (CHAMPOUX, 2001; WANG, 1996; BROWN, 1981).

TABELA 1 - SUBFAMILIAS DAS DNA TOPOISOMERASES	
Subfamília	DNA topoisomerasas
IA	DNA topoisomerasas I e III Bacterianas DNA topoisomerase III de leveduras DNA topoisomerasas III α e III β de <i>Drosophila melanogaster</i> DNA topoisomerasas III α e III β de mamíferos
IB	DNA topoisomerasas I eucarióticas DNA topoisomerase I mitocondrial de mamíferos DNA topoisomerase de poxvírus
IIA	DNA girase bacteriana DNA topoisomerase IV bacteriana DNA topoisomerase do fago T4 DNA topoisomerase II de levedura DNA topoisomerasas II de <i>Drosophila melanogaster</i> DNA topoisomerasas II α e II β de mamíferos
IIB	DNA topoisomerase VI de <i>Sulfolobus shibatae</i>
NOTA: A tabela mostra alguns membros representativos das subfamílias das DNA topoisomerase FONTE: Wang, 2002	

Vários tipos de reações são catalisadas pelas topoisomerasas; entre elas está a que causa mudanças no grau de super-enovelamento do DNA, isto é, a conversão de moléculas de DNA relaxadas em moléculas de DNA super-enoveladas (reação executada somente pelas topoll bacterianas) e o relaxamento de moléculas super-enoveladas (reação catalisada pelas topol e topoll, tanto bacterianas quanto eucarióticas) (FIGURA 1a). As topoisomerasas do tipo II podem também catalisar a formação e a dissolução de estruturas em forma de nó (*knots*) (FIGURA 1b) bem como a concatenação e dconcatenação de moléculas circulares (FIGURA 1c). As topoisomerasas do tipo I podem realizar as duas reações descritas anteriormente somente em moléculas circulares de fita simples ou se a molécula de DNA de fita dupla circular possuir uma das fitas clivada.

FIGURA 1 – REAÇÕES CATALISADAS POR DNA TOPOISOMERASES



1.2 TOPOISOMERASES DO TIPO IA

As topoisomerases do tipo IA apresentam várias propriedades em comum, tais como: (a) são todas monoméricas com uma única exceção, a girase reversa da bactéria *Methanopyrus kandleri*, uma enzima heterodimérica (KRAH, et al., 1996) (b) a clivagem do DNA é acompanhada pela ligação fosfodiéster envolvendo a extremidade 5' do corte e um resíduo de tirosina específico da enzima, (c) todas as enzimas requerem a exposição de uma região de fita simples de DNA, que serve como substrato, (d) todas as enzimas requerem o íon Mg^{2+} para o relaxamento do DNA, (e) plasmídeos que contêm somente super-enovelamento negativo, são substratos para a reação que leva ao relaxamento, (f) o relaxamento de super-enovelamento negativo não ocorre por completo (WANG, 1998), (g) estas enzimas são capazes de catalisar a formação de estruturas em forma de laços em DNAs circulares de fita simples, assim como promover a remoção de tais

laços (LIU, 1976). A concatenação e decatenação de moléculas de DNA de fita simples circulares, assim como a catenação e a decatenação de moléculas de DNA de fita dupla circulares desde que uma das moléculas apresente um corte em uma das fitas (TSE, WANG, 1980). As topoisomerasas do tipo IA têm como função principal a prevenção do excesso de super-enovelamento negativo, relaxando o DNA até que este adquira uma topologia adequada para a expressão dos genes. Por outro lado, estas enzimas apresentam uma baixa atividade de relaxamento de superenovelamento positivo, não podendo assim promover o movimento da forquilha de DNA durante a replicação (CHAMPOUX, 2002).

1.3 TOPOISOMERASES DO TIPO IB

As topoisomerasas do tipo IB, não apresentam homologia de sequência ou de estrutura com outras topoisomerasas, sendo funcionalmente distintas dos membros da subfamília IA. Tais enzimas podem promover relaxamento de superenovelamentos positivos e negativos por completo. Consistente com estas propriedades, essas enzimas não requerem a exposição de uma região de fita simples de DNA para realizar o relaxamento. As topoisomerasas do tipo IB clivam uma das fitas do DNA e ligam-se covalentemente a extremidade 3' do corte através de um resíduo de tirosina presente no sítio ativo da enzima. Diferentemente das topoisomerasas do tipo IA não requerem a ligação de íons metálicos para o relaxamento do DNA (CHAMPOUX, 2002).

1.4 TOPOISOMERASES DO TIPO II

As topoisomerasas do tipo II são compostas por mais de uma subunidade. As topoisomerasas II bacterianas (DNA girase, topoisomerase IV e topoisomerase VI) são tetrâmeros formados pela associação de duas subunidades distintas, enquanto que as topoisomerasas II eucarióticas e de poxyvirus (vírus vaccinia) são homodiméricas. A topoisomerase do bacteriófago T4 por sua vez é composta de três diferentes subunidades (VOSBERG, 1985; WANG, 1996).

O mecanismo de ação dessas enzimas envolve a clivagem da dupla fita do DNA e a ligação às extremidades 5' do corte na fita de DNA, através de um resíduo de tirosina. A mudança conformacional gerada pela ação da enzima separa as extremidades do corte no DNA, criando uma abertura ou intervalo pelo qual um outro segmento de DNA de fita dupla (da mesma molécula ou de moléculas de DNA distintas), atravessa o intervalo criado, podendo gerar de acordo com o movimento da dupla fita, o superenovelamento, o relaxamento, a catenação ou a decatenação destas moléculas. A ação destas enzimas requer Mg^{2+} e hidrólise de ATP, neste último caso, para a reciclagem da enzima. (OSHEROFF, SHELTON, BRUTLAG, 1983; ROCA, WANG, 1994). Entre todas as enzimas do Tipo II conhecidas, a DNA girase é a única capaz de usar a energia obtida na hidrólise de ATP para introduzir super-enovelamento negativo no DNA (GELLERT et al., 1976). Diferentes membros da família Topo II podem ser distinguidos por sua relativa eficiência nos processos de relaxamento versus decatenação ou catenação, sendo que tais propriedades refletem seus papéis especializados na célula.

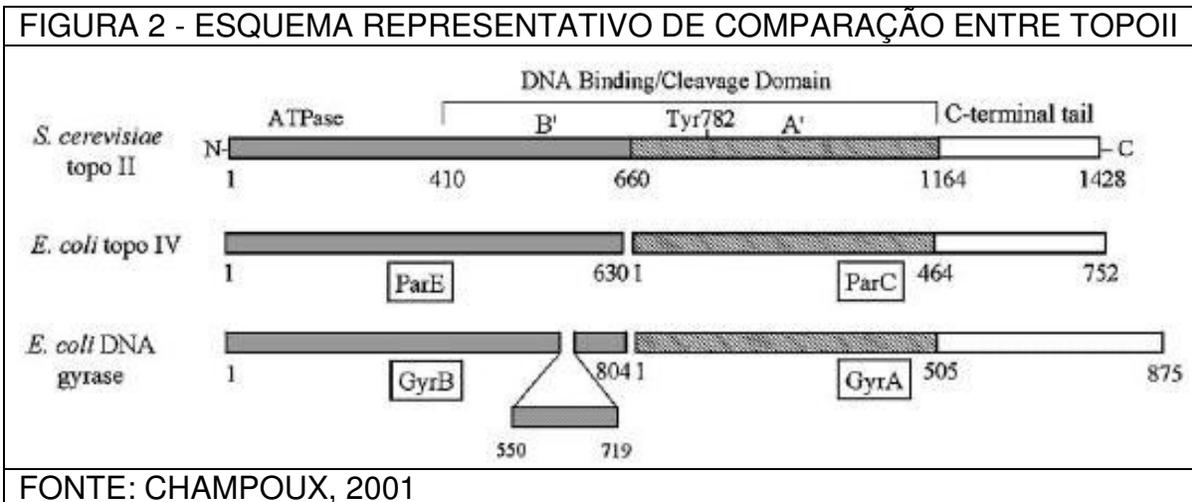
1.4.1 DNA Topoisomerasas do tipo IIA

O alinhamento das sequências das topoisomerasas do tipo IIA, em relação à DNA girase de *E. coli*, revela que esta subfamília de enzimas apresenta uma estrutura composta por 3 domínios. A subunidade B da DNA girase de *E. coli*

(GyrB) (atividade ATPásica) corresponde a subunidade ParE da topoisomerase IV de *E.coli* e a metade da região N-terminal das enzimas eucarióticas. Já a subunidade A da girase (Gyr A) (atividade de clivagem e religação do DNA), se alinha com a subunidade ParC da topoisomerase IV de *E. coli* e com a metade C-terminal das enzimas eucariotas (FIGURA 2). À exceção de uma inserção de 170 aminoácidos situada próxima a região C-terminal da GyrB, existe uma grande semelhança entre as sequências das diferentes enzimas do Tipo IIA. Entretanto, o domínio C-terminal só apresenta similaridade de sequência em espécies bastante relacionadas entre si e mesmo assim, somente na primeira metade deste domínio. A região C-terminal das enzimas Tipo IIA contem sequências de endereçamento para o núcleo e de interação com outras proteínas (ADACHI et al., 1997; SHAIU, HU, HSIEH, 1999; MIRSKI, GERLACH, COLE, 1999).

Na topoisomerase II de levedura e nos eucariotos em geral, a região homóloga aos primeiros 505 aminoácidos da GyrA é referida como A' e juntamente com a região B' forma o domínio de ligação e clivagem do DNA das topoisomerasas homodiméricas (FIGURA 2)..

O resíduo de tirosina do sítio ativo da DNA girase encontra-se a aproximadamente 120 aminoácidos do amino-terminal de GyrA e pode ser alinhado com aquele presente na região B'-A' das topoisomerasas eucarióticas. Já o sítio de ligação para moléculas de ATP situa-se na subunidade GyrB junto a região N-terminal. Logo após esta região, encontra-se o domínio C-terminal da GyrB, que é capaz de mediar a interação com a subunidade GyrA e para a comunicação entre as duas partes (AB) do tetrâmero (A₂B₂) (BJERGBAEK et al., 2000). A região da DNA girase que se enrola no segmento de fita dupla do DNA clivado, criando superenovelamento negativo, encontra-se localizada no domínio C-terminal da GyrA.

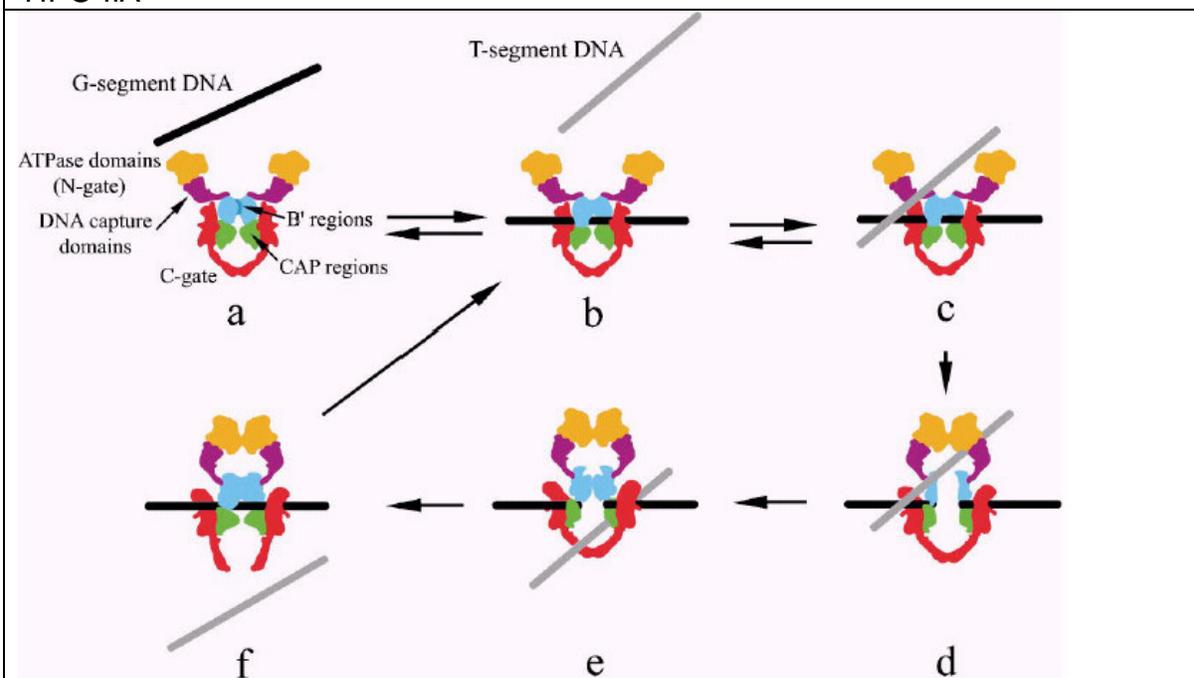


1.4.1.1 Como atuam as topoisomerases do tipo IIA

A subunidade GyrB contém, além do domínio ATPásico, o domínio de captura do DNA. Um diagrama da ação da DNA girase baseado em dados de sua estrutura tridimensional e interação com o DNA pode ser observado na figura 3. Nesse diagrama podemos observar que na fronteira das subunidades A e B, encontra-se o sítio de captura do segmento de DNA que será clivado (segmento G de DNA). Após esta região, já na subunidade GyrA, forma-se uma cavidade também referida como “C-gate” (próxima a região C-terminal da proteína) (FIGURA 3a). Depois que as duas fitas do segmento G são clivadas, ocorre a passagem de um segundo segmento de dupla fita de DNA (segmento T), que pode ou não fazer parte da molécula clivada (FIGURA. 3b→d). Este segmento T aloja-se então na cavidade do “C-gate” (FIGURA.3e). A partir desse ponto as mudanças conformacionais que ocorrem na Topo II e que levam a clivagem do DNA ainda não são bem compreendidas. Porém, a interação da enzima com o DNA que lhe serve de substrato, assim como a ligação de ATP, sua hidrólise e a liberação dos produtos formados nesta reação parecem estar diretamente relacionados com essas mudanças de conformação. Assim, uma vez que o DNA liga-se à enzima, as regiões CAP (sítios de ligação e clivagem desta molécula) permanecem na conformação fechada e as duas regiões B' encontram-se em grande proximidade (detalhes na FIGURA 3a). A ligação de ATP a um dos domínios com atividade

ATPásica parece levar ao fechamento do “N-gate” e conseqüentemente à clivagem do segmento G (FIGURA 3c→d). Logo em seguida, ocorre o afastamento das regiões CAP e a transferência do segmento T para a região do “C-gate” (FIGURA 3d→e). Uma vez que o segmento T é transportado, ocorre a religação do segmento G, o que levaria a abertura do “C-gate”, facilitando assim a liberação do segmento T da enzima (FIGURA 3f). O ciclo se completa com o rápido fechamento do “C-gate” (FIGURA 3f→b), que é provavelmente mediado pela hidrólise de uma segunda molécula de ATP. A liberação dos produtos de hidrólise de ATP promove a re-abertura do “N-gate” (FIGURA 3f→b), o que propicia um novo ciclo de clivagem e transporte de DNA pela topoisomerase.

FIGURA 3 MECANISMO DE AÇÃO PROPOSTO PARA AS TOPOISOMERASES TIPO IIA



NOTA: A figura ilustra a clivagem do segmento G e o transporte do segmento T pela dupla fita de DNA clivada.
 FONTE: CHAMPOUX, 2001

1.4.2 Topoisomerases do tipo IIB

O protótipo das enzimas pertencentes à subfamília do tipo IIB é a Topoisomerase VI de *Sulfolobus shibatae* (reino Archea), sendo que enzimas similares são encontradas em todos os outros microrganismos do reino Archea até agora seqüenciadas (BERGERAT et al., 1997). Da mesma forma que as topo II bacterianas, a topo VI é um heterotetrâmero composto por duas subunidades A e B. Esta enzima é capaz de relaxar DNA superenovelado positivamente e negativamente, concatenar e decatenar moléculas de DNA circulares na presença de ATP e cátions divalentes.

As seqüências de aminoácidos das duas subunidades da DNA Topoisomerase VI compartilham apenas pequena homologia com as topoisomerases do tipo IIA (BERAGERAT et al., 1997). A estrutura geral da subunidade A da topo VI é distinta de todas topolIA e apresenta homologia com a proteína Spo11 de *S.cerevisiae*, que está envolvida na clivagem da dupla fita de DNA durante o processo de recombinação que ocorre na meiose (KEENEY, KLECKNER, 1995; KEENEY, GIROUX, KLECKNER, 1997). Já a subunidade B apresenta um domínio de aproximadamente 200 resíduos de aminoácidos na região N-terminal que é homólogo a uma família de proteínas chamadas de ATPases tipo-GHKL, (BERAGERAT et al., 1997; DUTTA, INOUE, 2000). Apesar da topoVI não apresentar grande homologia com as topoisomerases IIA elas contêm os domínios funcionais de hidrólise de ATP e clivagem e religação (BERAGERAT et al., 1997).

1.4.2.1 Como atuam as topoisomerases do tipo IIB

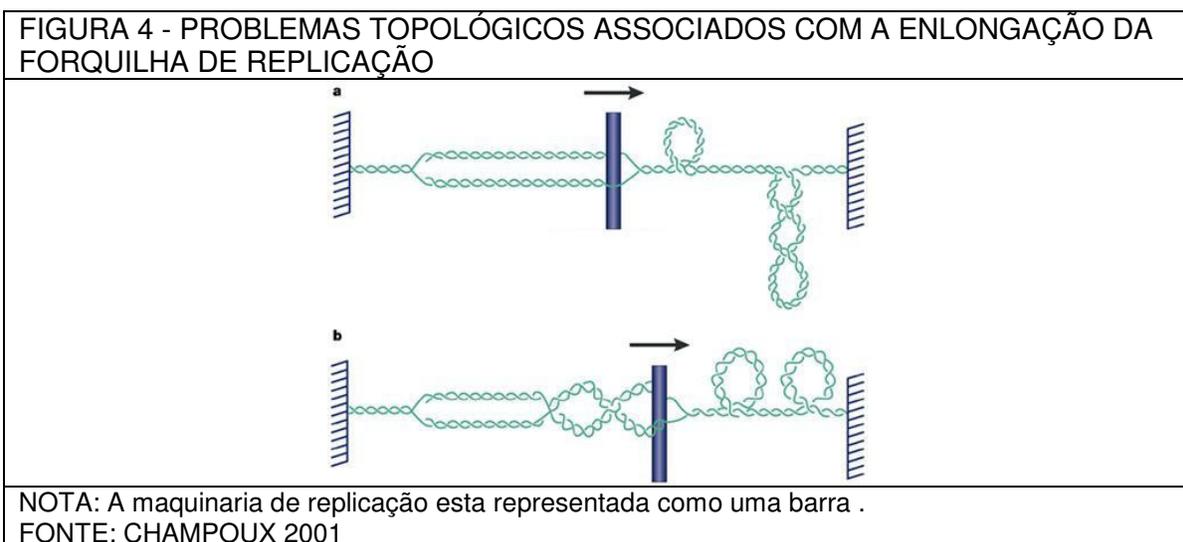
O mecanismo de ação das topo IIB é pouco conhecido, mas sabe-se que uma leve rotação das regiões CAP, promove a justaposição do sítio ativo contendo os resíduos de tirosina com o DNA a ser clivado. A característica mais intrigante da topo VI é a ausência de uma cavidade equivalente ao “C-gate” descrito em Topo IIA para acomodar o segmento T uma vez transportado. A relação espacial entre a subunidade B ATPásica e a subunidade A, ainda é desconhecida, mas parece que

o domínio B é capaz não só de capturar o DNA a ser clivado, como também de formar uma ponte que mantém a subunidade A ligada.

1.5 O PAPEL DAS TOPOISOMERASES EM PROCESSOS BIOLÓGICOS

1.5.1 Topoisomerases na replicação

As alterações topológicas da molécula de DNA geradas pelo avanço da maquinaria de replicação e o papel das diferentes DNA topoisomerases neste processo dependem de que maneira a maquinaria de replicação se movimenta ao longo do DNA (LIU, WANG, 1987). A replicação é um dos processos mais conhecidos que geram superenovelamento na molécula de DNA. Durante a replicação semiconservativa, se a maquinaria de replicação é impedida de girar ao redor do DNA, então superenovelamento positivo é gerado à frente da forquilha de replicação, enquanto atrás desta, a bolha de replicação torna-se progressivamente maior (FIGURA 4a) (COOK, 1999) . As topoisomerases do tipo II e do tipo IB devido as suas eficiente atividade de relaxação de super-enovelamento positivo tem um papel fundamental na remoção desse super-enovelamento gerado a frete da maquinaria de replicação (WANG, 1996).



Se considerarmos que a maquinaria de replicação pode girar ao redor do eixo do DNA, o superenovelamento positivo gerado a frente da forquilha de replicação pode ser redistribuído para a região atrás desta, podendo levar ao entrelaçamento do par de fitas duplicadas e ou um super-enovelamento positivo nesta região (FIGURA 4b) (WANG, 2002).

Neste modelo de replicação as topoisomerases tipo II e do tipo IB também possuem um papel fundamental na remoção do superenovelamento positivo gerado a frente da maquinaria de replicação sendo que a DNA topoisomerase II pode agir também atrás da forquilha de replicação removendo o entrelaçamento das duplas fitas recém sintetizadas (POSTOW et al., 2001). A topoisomerase do tipo IA pode remover o superenovelamento positivo somente se houver uma região de fita simples clivada (WANG, 1996). Deste modo a topo IA é menos necessária que as topoisomerases do tipo II e IB no processo alongação da cadeia de DNA na replicação.

Estudos em vários organismos suportam as proposições acima. Em *Saccharomyces cerevisiae*, tanto a topoisomerase do tipo IB quanto a do tipo IIA mas não a do tipo IA podem promover a etapa de alongação na replicação (KIM, WANG, 1989). Em *Drosophila melanogaster*, a topoisomerase do tipo IB é essencial em todas as etapas do desenvolvimento que estão comprometidas com proliferação celular (ZHANG et al., 2000). A DNA topoisomerase III de *E. coli* (topo IA) pode promover a replicação de plasmídeo *in vitro*, mas a capacidade de suportar o alongação da cadeia de DNA na replicação é incerta. O envolvimento de varias topoisomerases na remoção do superenovelamento positivo gerado pela replicação está de acordo com suas especificidades *in vitro*.

1.5.2 Topoisomerases na transcrição

No processo de transcrição assume-se que é mais fácil o DNA girar ao redor do seu eixo do que a maquinaria de transcrição girar ao redor do DNA (LIU, WANG, 1987). Diversos eventos podem impedir a maquinaria de transcrição girar

ao redor do DNA, como por exemplo, a co-tradução e inserção do peptídeo nascente na membrana celular em procariotos (LYNCH, WANG, 1993). Deste modo a transcrição em si gera superenovelamento positivo à frente e negativo atrás em relação ao sítio de translocação da RNA polimerase (LIU, WANG, 1987). Em *E. coli*, a DNA topoisomerase IIA, mais especificamente a DNA girase, deve ser a principal responsável pela remoção do superenovelamento positivo enquanto a topo I é responsável pela remoção do super-enovelamento negativo (WANG, 1996). A suposição de que a DNA girase e a topoisomerase I regulam o superenovelamento *in vivo* é apoiada na observação de que mutantes *topA* de *E. coli* não são viáveis a menos que adquiram mutações compensatórias, algumas das quais reduzem o nível de expressão da girase (DINARDO et al., 1982).

Em eucariotos a mobilidade da maquinaria de transcrição pode ser reduzida por sua associação com a membrana nuclear (COOK, 1999) ou pelo evento de transcrição com tradução simultânea no núcleo (IBORRA, JACKSON, COOK, 2001).

Em leveduras a inativação da topoisomerase I não tem grande influência sobre o crescimento celular podendo haver neste caso um efeito compensatório pela topoisomerase II. Porém, a simultânea inativação das DNA topoisomerases I e II leva a uma grande redução na síntese RNA ribossomal e uma moderada redução na síntese do mRNA (BRILL et al., 1987; UEMURA, YANAGIDA, 1984). Em cultura de linfócitos B, a transcrição de diversos genes pela pol II é sensível à inibição da topoisomerase (COLLINS, WEBER, LEVENS, 2001). Uma ligação direta entre a atividade das topoisomerases e o processo de transcrição é difícil de ser estabelecido *in vivo* devido às múltiplas funções da enzima e da complexidade experimental do sistema. Experimentos de transcrição *in vitro*, utilizando a holoenzima RNA polimerase II purificada e a cromatina como molde, mostrou que a transcrição é dependente da atividade da topo II uma vez que quando sua atividade era inibida pelo etoposide, um inibidor clássico de topoll eucariótica, a transcrição também era inibida (MONDALAND, PARVIN, 2001). Em contraste, a inibição da topo II não teve efeito na transcrição quando o DNA molde livre de histonas e proteínas acessórias foi utilizado. Este resultado sugere que a topoll

em associação com outros fatores de transcrição modifica a topologia do DNA possibilitando a transcrição (MONDALAND, PARVIN, 2001).

1.5.3 Topoisomerases na recombinação

Estudos em *E. coli* mostraram que as topo IA em bactérias podem estar envolvidas no processo de recombinação mediado por RecA atuando na resolução específica de intermediários da recombinação antes da segregação dos cromossomos (ZHU, PONGPECH, DIGATE, 2001). Mutantes *top3* Δ de *S. cerevisiae* são viáveis, embora apresentem um complexo fenótipo que inclui lento crescimento, redução na viabilidade, hiper-recombinação entre seqüências repetitivas, hiper-sensibilidade a agentes causadores de danos ao DNA e não são capazes de esporular (WALLIS et al., 1989). Em contraste, em *Schizosaccharomyces pombe* o gene *top3* é essencial para viabilidade, sendo que mutantes *top3* Δ são incapazes de segregar adequadamente as cromátides irmãs durante a mitose (GOODWIN et al., 1999). Interessantemente, mutações nos genes da família ReaQ, SGS1 ou RQH1, encontrados em *S. cerevisiae* e *Sc. pombe* respectivamente, podem suprimir os defeitos causados pela falta do gene *Top3* (MAFTAH et al., 1999). Uma interpretação para essa interação genética, é que as RecQ helicases atuam antes da topoisomerase III em uma mesma via bioquímica e que as RecQ helicases produzem uma estrutura de DNA que requer uma topoisomerase III para sua resolução (WU, HICKSON, 2001). Em *S. cerevisiae*, Sgs1p e Top3p também interagem fisicamente, sugerindo a possibilidade Sgs1p recrutar Top3p para seu sítio de ação (BENNETT, WANG, 2001; FRICK, KALIRAMAN, BRILL, 2001). Outra topoisomerase envolvida no processo de recombinação é a topolIB SPO11. Estudos em *S. cerevisiae* mostraram que esta enzima se liga covalentemente a extremidade 5' da dupla fita de DNA quebrada nos sítios de alta freqüência ("hot-spots") de recombinação durante a meiose (KEENEY, 2001).

1.6 INIBIDORES DE TOPOISOMERASES

Considerando o papel das topoisomerases no metabolismo do DNA de procariotos e eucariotos, estas enzimas são importantes alvos bactericidas e de drogas anti-tumorais (SCHNEIDER, HSIANG, LIU 1990; ZHANG, D'ARPA, LIU, 1990). Com relação aos seres procariotos, vários antibióticos apresentam especificidade para a subunidade GyrA ou para a subunidade GyrB da DNA girase. Por outro lado, não se conhecem inibidores da topol bacteriana (WANG, 1996; CHAMPOUX, 2001).

A subunidade GyrA é o alvo das quinolonas, como o ácido nalidíxico e seus derivados, entre eles o ofloxacin, o norfloxacin, o perfloxacin e o ciprofloxacina. Já a subunidade GyrB, é inibida pelas coumarinas, sendo que a novobiocina está entre as mais potentes. Esses dois grupos de antibióticos têm diferentes mecanismos de ação. Acredita-se que a novobiocina, embora sem similaridade estrutural com o ATP, compete com este pelo sítio de ligação na enzima. A novobiocina poderia bloquear o acesso do ATP à enzima sem compartilhar o sítio de ligação ou alterar a conformação da enzima diminuindo assim a afinidade por este cofator (COZZARELI, 1980). O ácido nalidíxico bloqueia as atividades envolvidas na reação de quebra e religação das fitas do DNA, que é mediada pela subunidade A.

As conseqüências do tratamento de células bacterianas com esses agentes são complexas e incluem vários efeitos. O efeito mais marcante é sobre o superenovelamento do DNA e portanto, em última instância, sobre a própria expressão gênica.

Do mesmo modo que a topoisomerase II bacteriana é um importante alvo terapêutico para vários antibióticos, a topoisomerase II eucariótica foi identificada como um importante alvo celular para potentes inibidores tumorais. Muitos deles, como a adriamicina, a actinomicina D e VP-16 (etoposídeo), são usados clinicamente para tratar diversos tipos de câncer.

Os inibidores da topoisomerase II eucariótica podem ser divididos em duas categorias: os que se ligam, mas não se intercalam ao DNA e aqueles que

são fortes agentes intercalantes do DNA. Representando o primeiro grupo, estão as epipodofilotoxinas que incluem a VP-16 e VM-26 (tenoposídeo) já o segundo grupo, é composto de drogas como a 4'-(9-acridinylamino) methanesulfon-*m*-anisidide (*m*-AMSA), a elipticina e a adriamicina (LIU, 1989). Todos esses inibidores afetam a DNA topoisomerase II de uma maneira específica, formando complexos com o DNA e a enzima durante a reação de clivagem do DNA.

Os mecanismos que geram os efeitos citotóxicos causados pelos inibidores de topoisomerase ainda não estão definidos. Contudo, a interferência no metabolismo do DNA parece ser uma das principais causas da morte celular. A formação do complexo droga-DNA-enzima pode bloquear o movimento da forquilha de replicação, inibindo a síntese e levando à fragmentação do DNA (D'ARPA et al., 1990; ZHANG, D'ARPA, LIU, 1990). O alto nível de topoisomerasas em tumores com alta taxa de proliferação, explica a seletividade desses inibidores para essas células.

Muita ênfase tem sido dada ao entendimento do processo de desenvolvimento da resistência a esses inibidores e aos mecanismos moleculares associados a essa resistência. Um desses mecanismos é conhecido como multi-resistência a drogas ou MDR (do inglês Multi Drug Resistance) (ISABELA et al., 1991). O MDR é um dos mais bem caracterizados mecanismos de resistência e envolve a remoção da droga do citoplasma através de um processo ativo de transporte (ENDICOTT, LING, 1989). A diminuição da atividade das topoisomerasas por redução dos níveis celulares da enzima ou de alterações na sua estrutura também está entre os mecanismos de resistência celular a ação das drogas (ZIJLSTRA et al., 1990).

1.7 ESTUDO DAS TOPOISOMERASES EM TRIPANOSOMATÍDEOS

Os tripanosomatídeos vêm sendo alvo de intensos estudos nas diversas áreas das Ciências Biológicas, uma vez que vários membros desta família são agentes causadores de doenças ao homem e também a animais e plantas. As doenças mais conhecidas são provocadas por protozoários dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, entre elas podemos citar a doença de Chagas, a doença do sono e a leishmaniose. Tais protozoários apresentam algumas características peculiares como a presença de um único flagelo com axonema e uma complexa estrutura paraxial; mitocôndria única e ramificada contendo uma região alargada com acúmulo de DNA denominada cinetoplasto; microtúbulos subpeliculares associados à membrana plasmática (DE SOUZA, 1999). Existem ainda nesta família outros protozoários não patogênicos e que apresentam ao longo de todo o seu ciclo de vida um único hospedeiro invertebrado. Entre tais tripanosomatídeos, ditos monoxênicos, existem cinco espécies que possuem uma bactéria simbiótica em seu citoplasma. Quando observados por microscopia eletrônica de transmissão, a matriz do endossimbionte apresenta duas regiões distintas; uma mais clara que contém fibrilas de DNA e outra mais escura que é rica em ribossomos (DE SOUZA, MOTTA, 1999).

Em relação ao cinetoplasto, sabe-se que aproximadamente 30% do DNA dos tripanosomatídeos se encontram nessa estrutura. O DNA do cinetoplasto (kDNA) é formado por dois tipos de moléculas: os minicírculos (com tamanho entre 0,5 a 2,5 Kb) e os maxicírculos (com tamanho variando entre 20 a 38 Kb). Cerca de 10.000 minicírculos e 50 maxicírculos se encontram catenados, formando uma extensa rede de kDNA. Os maxicírculos codificam RNAs ribossomais e proteínas mitocondriais, já os minicírculos estão envolvidos na formação de pequenos RNAs guias que controlam o processo de edição do RNAm formado a partir dos maxicírculos (SIMPSON et al., 2000). Os minicírculos de uma determinada espécie são altamente heterogêneos quanto à sequência de nucleotídeos, embora o tamanho destes círculos dentro da rede de kDNA seja idêntico (SHAPIRO, ENGLUND, 1995). Entretanto, tem sido relatado que o kDNA dos minicírculos de *T. rangeli* e *C. oncopelti* apresentam classes de diferentes

tamanhos (VALLEJO et al.,1994; PESTOV et al.,1990). Apesar da grande heterogeneidade, os minicírculos de todos os tripanosomatídeos apresentam pelo menos uma região conservada, que corresponde à origem de replicação. Já os maxicírculos são mais homogêneos quanto as sequências de DNA, apresentando um maior número de regiões conservadas (SHAPIRO, ENGLUND, 1995)

O arranjo do kDNA varia entre os diferentes protozoários desta família. Nas formas amastigota e epimastigota de *T. cruzi*, o cinetoplasto se apresenta como um bastão com o kDNA bastante compactado. Já em formas tripomastigota de *T. cruzi* a rede de kDNA torna-se menos compacta e a forma em bastão dá lugar a uma forma arredondada, semelhante a uma cesta (DE SOUZA,1984). Nos tripanosomatídeos que apresentam simbiote em seu citoplasma, o cinetoplasto apresenta uma organização característica, onde as fibrilas de DNA apresentam um arranjo mais largo e frouxo (FREYMULLER, CAMARGO, 1981).

A replicação do kDNA é um processo complexo e restrito à fase S do ciclo celular (SHAPIRO, ENGLUND, 1995; HINES, RAY, 1997). Neste processo os minicírculos covalentemente ligados são individualmente decatenados e liberados da região central da rede de kDNA. Uma vez livres, os minicírculos migram para um dos dois complexos protéicos situados em pólos opostos da periferia do cinetoplasto. Tais complexos possuem as enzimas necessárias para a replicação do kDNA. Os novos minicírculos sintetizados, que possuem um pequeno intervalo em sua seqüência, são religados à periferia da rede. Esses intervalos permitem distinguir os minicírculos já replicados daqueles que ainda não sofreram replicação, de modo que cada minicírculo seja replicado somente uma vez por ciclo celular. Após todos minicírculos terem sido replicados, esses intervalos são reparados. Se os minicírculos são religados à rede em regiões adjacentes aos complexos de replicação, resta saber como eles se tornam uniformemente distribuídos ao redor da periferia. O modelo atual sugere que uma rotação do cinetoplasto durante a replicação permite que os novos círculos se distribuam uniformemente pela rede de kDNA (SHLOMAI, 1994; SHAPIRO, ENGLUND, 1995). Os maxicírculos, que formam um catenado independente dentro da matriz

de minicírculos, permanecem ligados à rede durante o processo replicativo e são sintetizados por um mecanismo conhecido como ciclo-rolante (SHAPIRO, 1993).

As diversas inter-conversões topológicas do kDNA necessárias para sua replicação são catalisadas por topoisomerasas (ENGLUND, MARINI, 1980; SHAPIRO, 1993). Em tripanosomatídeos essas enzimas têm um importante papel na replicação do DNA do cinetoplasto, já que atuam na liberação dos minicírculos da rede de kDNA para que estes se repliquem como moléculas livres, catalisam a segregação dos novos minicírculos sintetizados e religam os mesmos à rede de DNA. Além da atividade catalítica, a topo II parece ter também um papel estrutural de ancoragem dos maxicírculos à membrana mitocondrial e na mediação da movimentação dos maxicírculos durante a replicação (SHAPIRO, SHOWALTER, 1994).

Diversos inibidores de topoisomerasas têm se mostrado eficazes em promover alterações no DNA nuclear e mitocondrial dos tripanosomatídeos. Drogas que atuam sobre a DNA girase como o ofloxacin, o tarivid, o ácido nalidixico e a novobiocina, inibem a proliferação de diferentes espécies de tripanosomatídios, além de promoverem alterações ultraestruturais no núcleo e no cinetoplasto deste protozoário (GONZALEZ-PERDOMO et al., 1990). Já o etoposide, um inibidor de topoisomerase II eucariótica, promove a linearização dos minicírculos assim como o acúmulo de pequenos catenados desses círculos (principalmente na forma de dímeros) quando *T. equiperdum* é tratado com essa droga (SHAPIRO et al., 1989; SHAPIRO, SHOWALTER, 1994). A inibição da topoisomerase II com etoposide resulta ainda na liberação de praticamente todos os maxicírculos da rede de kDNA, além de promover a clivagem do DNA nuclear (SHAPIRO, 1993b, SHAPIRO ; SHOWALTER, 1994)

O aprofundamento desses estudos nos levaram à caracterização do gene que codifica a enzima topoisomerase do tipo II (topoII) de *T. cruzi* (FRAGOSO, GOLDENBERG, 1992) e sua localização do seu compartimento celular (FRAGOSO et al., 1998). Contudo, tentativas de estudar a topoisomerase II desse parasita se mostraram até agora frustrantes, por diversas razões, entre elas estão: 1) o baixo nível de expressão da enzima no parasita, 2) A

patogenicidade do parasita, impedindo de trabalhar com grandes volumes de cultura. Entretanto o estudo de topoisomerasas do tipo II de outros tripanosomatídeos não patogênicos poderia sobrepor o problema de trabalhar com *T.cruzi*.

Os tripanosomatídeos não patogênicos apresentam ao longo de todo o seu ciclo de vida um único hospedeiro invertebrado. Dentre eles está a espécie *Blastocrithidia culicis*. *B.culicis* é um tripanosomatídeo que coloniza insetos e que pode ser cultivado *in vitro* em alta densidade, podendo ser obtida uma grande quantidade de biomassa em um tempo relativamente curto (dois dias), além de poder trabalhar com grandes volumes de cultura (BRUESKE, 1967).

Estas características nos levaram a escolher a topoisomerase II de *B. culicis* como modelo no estudo das topoisomerasas de tripanosomatídeos já que estas características facilitam a obtenção de DNA ou RNA ou ainda a purificação da topo II nativa. Acreditamos que os dados obtidos com essa enzima, poderão ser extrapolados para topo II de tripanosomas e leishmanias, uma vez que entre diversos tripanosomatídeos, o gene que codifica essa proteína é bastante conservado entre eles e a sequência de aminoácidos deduzida a partir deles apresenta 70-80% de similaridade. Dessa maneira, poderemos avaliar o efeito de inibidores específicos sobre a enzima nativa e/ou recombinante, sem manipular tripanosomatídeos patogênicos, cujo cultivo é arriscado e dispendioso.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Clonar e caracterizar o gene que codifica a enzima DNA topoisomerase de *B.culicis* (*BcTOP2*), com a finalidade de estabelecer relações de identidade com topoisomerasas de outros tripanosomatídeos, que permitam validar a utilização dessa enzima como modelo para o estudo das topoisomerasas de tripanosomas e leishmanias.

2.1.1 Objetivos específicos

1. Clonagem do gene que codifica a topoisomerase do tipo II de *B.culicis* por PCR e varredura de biblioteca genômica.
2. Expressão e purificação da topoisomerase II de *B.culicis* (BcTOPOII) recombinante.
3. Obtenção de antisoro policlonal contra a BcTOPOII recombinante para estudos de expressão da enzima por *western blot* e para determinação de sua localização celular (núcleo e/ou mitocôndria), por microscopia confocal e eletrônica de transmissão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS

- *Crithidia fasciculata* e *Blastocrithidia culicis* (cepas normal e curada), cedidas pela Dra. Maria Cristina M. Motta do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- *Escherichia coli*, cepas:
- LE392 F⁻, e14⁻ (McrA⁻), hsdR514 (r_k⁻m_k⁺), supE44, supF58, lacY1 ou Δ(lacIZY)6, galK2, galT22, metB1, trpR55
- TOP 10F' {lac I^q, Tn 10 (Tet^R) mer A Δ (mrr-hsd RMS-merBC) θ 80 lacZ Δm15 ΔlacX74 deoR recA1 ara D139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (str^R) end A1 nupG
- M15 (Na^s, Str^s, Rif^s, Thi⁻, Lac⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺).

3.2 PLASMÍDEOS E VETORES DERIVADOS DE BACTERIÓFAGOS

- pBluescript (KS+) (STRATAGENE)
- pDK-101 (KOVALIC, KWAK, WEISBLUM, 1991).
- pQE30 (QIAGEN)
- pQE8 (QIAGEN)
- λEMBL3 digerido com *Bam*HI e desfosforilado (0,5 μg/μl) (PROMEGA)

3.3 MARCADORES DE PESO MOLECULAR PARA GÉIS

- DNA do fago λ digerido com *Hind* III (USB)
- RNA ladder 0,24 a 9,5 Kb (INVITROGEN)
- 1 Kb DNA ladder (INVITROGEN)
- Marcador de peso molecular Benchmark (INVITROGEN)

3.4 NUCLEOTÍDEO MARCADO RADIOATIVAMENTE

- α - [^{32}P] - dCTP (3.000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) (AMERSHAM BIOSCIENCES)

3.5 MEIOS DE CULTURA

- Meio LB (Luria-Bertani): Bacto-triptona 10 g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 5 g/l
- Meio LB/Mg: LB contendo sulfato de magnésio 10 mM.
- Meio LB/amp: LB contendo ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Meio LB /amp/cana (LB contendo ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; canamicina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
- Meio LB/amp/IPTG/X-gal: LB/amp contendo IPTG 0,1 mM, X-gal 0,002%
- Meio LB/tet: LB contendo tetraciclina 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

3.6 SOLUÇÕES

- Clorofórmio/ álcool isoamílico:
24 volumes de clorofórmio saturado com água e um volume de álcool isoamílico.
- Fenol/clorofórmio:
24 volumes de fenol saturado com tris base 100 mM, 24 volumes de clorofórmio e um volume de álcool isoamílico.
- PBS:
Tampão fosfato 20 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM.
- PBS/Tween:
PBS contendo o detergente Tween 20 na concentração de 0,05%.
- Solução de Denhardt's 50 X:
Ficoll 0,5% ; polivinilpirrolidone 0,5% ; albumina de soro bovino 0,2%
- Solução de hibridação para *Northern blot*:

SSC 6 x; DNA de esperma de salmão 100 μ /ml; solução de Denhardt 5 x; SDS 1%; formamida 50%

- Solução de hibridação para *Southern blot*:

SSC 6 x; DNA de esperma de salmão 100 μ /ml; solução de Denhardt 5 x; SDS 1%.

- Solução para desnaturação:

NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M

- Solução de neutralização:

Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0; NaCl 1,5 M

- Solução de Ponceau S:

Ponceau S 0,5% em ácido acético 1%

- SM:

Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 100 mM; MgSO₄ 8 mM; Gelatina 0,01%

- Solução para coloração de géis de proteína:

coomassie blue R-250 (PIERCE) 0,1% em metanol/ácido acético (45%/10%)

- Solução para descoloração de géis de proteína:

metanol 4%, ácido acético 7,5%

- SSC 20X:

citrato de sódio 0,3 M e NaCl 3 M pH 7,0.

- Tampão da fosfatase alcalina:

Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM

- Tampão de amostra para géis de proteína:

Tris-HCl 125 mM pH 6,8; SDS 2%; 2-mercaptoetanol 5%; Glicerol 12%; azul de bromofenol 0,012%

- Tampão de bloqueio imunofluorescência:

BSA 1% diluído em PBS

- Tampão de bloqueio imunocitoquímica:

BSA 3%, Tween 20 0,3% diluído em PBS

- Tampão de bloqueio para *Western blot*:

PBS, 1 X, Tween 20 a 0,05 %, 5 % leite desnatado.

- Tampão de eletroforese para géis de proteína 5 X:

Tris 0,037 M, glicina 0,3 M pH 8,4; SDS 0,1%.

- tampão de fixação imunocitoquímica

glutaraldeído 0,3%, sacarose 0,25 M, formadeído 4%, ácido pírico 1% diluído em tampão cacodilato 0,1M, pH7,2

- Tampão de lise hipotônico:

Tris-HCl 10 mM pH 7,6, MgCl₂ 5 mM, NaCl 10 mM, b-mercaptoetanol 5 mM.

- Tampão NKM:

NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1,5 mM, HEPES 10 mM pH 7,4.

TBE

Tris-base 100 mM; ácido bórico 100 mM; EDTA 2,5 mM, pH 8,3.

- TE:

Tris-HCl 10 mM; pH 7,5; EDTA 1 mM.

TABELA 2 – ENZIMAS E TAMPÕES DAS ENZIMAS	
Enzima / Fornecedor	Tampão
<i>Bam</i> HI (Biolabs)	10X (NaCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, MgCl ₂ 100 mM, DTT 10 mM, pH 7.9)
<i>Bgl</i> II (Biolabs)	10X (NaCl 1000 mM, Tris-HCl 500 mM, MgCl ₂ 100 mM, DTT 10 mM, pH 7.9)
Fosfatase alcalina (CIP) (Promega)	NaCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, MgCl ₂ 100 mM, DTT 10 mM, pH 7.9
<i>Hind</i> III (Biolabs)	10X (NaCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, MgCl ₂ 100 mM, DTT 10 mM, pH 7.9)
<i>Sac</i> I (Biolabs)	10X (Bis Tris Propano-HCl 100 mM, MgCl ₂ 100 mM, DTT 10 mM , pH 7.0)
<i>Sac</i> II (Biolabs)	10X (Acetato de potássio 500 mM, 200 mM Tris-acetato, acetato de magnésio 100 mM, DTT 10 mM, pH 7.9)
<i>Sal</i> I (Biolabs)	10X (NaCl 1000 mM, Tris-HCl 500 mM, MgCl ₂ 100 mM, DTT 10 mM, pH 7.9)
<i>Sau</i> 3AI (Biolabs)	10X (Bis Tris Propano-HCl 100 mM, MgCl ₂ 100 mM, DTT 10 mM , pH 7.0)
Taq DNA polimerase (Invitrogen)	10X (NaCl 1000 mM, Tris-HCl 500 mM, MgCl ₂ 100 mM, DTT 10 mM, pH 7.9)
T4 DNA ligase (Invitrogen)	5X (Tris-HCl 2500 mM pH 7.6, MgCl ₂ 500 mM, ATP 50 mM, DTT 50 mM, polietilenoglicol –8000 25% p/v)
<i>Xcm</i> I (Biolabs)	10X (NaCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, MgCl ₂ 100 mM, DTT 10 mM, pH 7.9)

3.7 CULTIVO CELULAR

B. culicis e *C. fasciculata* foram cultivadas à 28 °C, em meio Warren (WARREN, 1960) contendo 10% de soro fetal bovino.

T. cruzi (formas epimastigotas) foram cultivados em meio LIT (CAMARGO, 1964) à 28 °C.

3.8 ISOLAMENTO DO DNA TOTAL DE *B. culicis*

As células foram cultivadas em meio Warren até a densidade de 5×10^7 células ml^{-1} . Os parasitas (1×10^{11}) foram coletados por centrifugação a $9.600 \times g$ por 10 minutos a 4°C. As células foram lavadas em tampão NKM e ressuspensas em 20ml de tampão de lise hipotônico e lisadas rapidamente com o detergente NP-40 (SIGMA) na concentração final de 0,5% em homogeneizador Dounce durante 3 minutos. A lise celular foi monitorada em microscópio óptico e interrompida pela adição da sacarose em tampão NKM na concentração final de 0,25 M. Os núcleos celulares foram parcialmente purificados através de três ciclos de centrifugação a $800 \times g$ por 10 minutos a 4°C. Essa fração foi digerida com RnaseA 10 $\mu\text{g/ml}$, livre de DNase I, durante 2 horas a 37°C e posteriormente digerida com proteinase-K(SIGMA) 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ por 12 horas em (NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, SDS 0,5%, Tris-HCl 10 mM, pH 7,6) . O DNA foi extraído com fenol saturado em Tris base 100 mM e dialisado várias vezes contra (NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,6).

3.9 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DE *B.culicis*

O RNA total do protozoário foi purificado segundo modificações do método de (KARLINSEY et al., 1989). Resumidamente, as células (1×10^9 a 1×10^{10}) foram lisadas em tampão de lise (isotiocianato de guanidina 5 M, EDTA 10 mM, 2-mercaptoetanol 8% (v/v), Tris-HCl 50 mM pH 8,0). Sete volumes de LiCl 4M foram então adicionados para fazer a precipitação diferencial do RNA em relação do DNA. Após centrifugação ($12.000 \times g$ por 15 min), o sobrenadante (que contém

DNA foi descartado e o RNA total (sedimento) foi ressuspensão em LiCl 3M. O material foi centrifugado nas mesmas condições anteriores. Essa operação foi repetida por duas vezes. O sedimento foi então ressuspensão em solução de Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 10 mM e SDS 0,1% e posteriormente extraído com fenol/clorofórmio. Após precipitação com etanol o RNA foi ressuspensão em água ultrapura tratada com DEPC e sua quantidade foi determinada por espectrofotometria a 260 nm.

3.10 PREPARAÇÃO DE VETORES

- pBluescript/*Bam*HI, pBluescript/*Sac*II, pBluescript/*Eco*RV e pBluescript/*Sal*I
O vetor pBluescript KS+ (1 µg) foi digerido separadamente com 20 unidades das enzimas de restrição *Bam*HI, *Sac*II, *Eco*RV ou *Sal*I em um volume de 20 µl a 37°C por 2 horas.

- pQE30/*Bam*HI
O vetor pQE8 (1 µg) foi digerido com 20 unidades da enzima de restrição *Bam*HI em um volume de 20 µl a 37°C por 2 horas .

- pQE30/*Bam*HI/*Hind*III
O vetor pQE30 (1 µg) foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III (20 unidades de cada enzima) em um volume de 20 µl a 37°C por 2 horas.

- pDK-101/*Xcm*I
O vetor pDK-101(1 µg) foi digerido com 20 unidades da enzima de restrição *Xcm*I em um volume de 20 µl a 37°C por 2 horas.

Todos os plasmídeos digeridos foram purificados por extração com igual volume de fenol/clorofórmio e precipitadas através do acréscimo de um décimo do volume da reação de acetato de sódio 3 M pH 6,0 e dois volumes de etanol absoluto. Após incubação por 16 horas a -20°C, o material foi centrifugado a 12.000 x g a temperatura ambiente, lavado com etanol 70%, seco a vácuo e ressuspensão em 20µl de TE.

Os vetores pQE8/*Bam*HI, pBluescript/*Sac*II,pBluescript/*Bam*HI e pBluescript/*Sal*I foram desfosforilados pela CIP. Para tanto, 0,5 µg de cada vetor

foi misturado com uma unidade de CIP em 20 µl de tampão da CIP, A mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos. Após a incubação os plasmídeos foram purificados como citado no item anterior.

3.11 LIGAÇÃO

A ligação de fragmentos de DNA com os plasmídeos (relação molar 3:1) foi feita pela adição de 1ul de tampão 10 X da enzima T4 ligase e uma unidade da enzima T4 DNA ligase. O volume da ligação foi ajustado com água ultra-pura para 10 µl e incubada a 16°C por 18 horas.

3.12 PREPARAÇÃO DE *E. coli* CÁLCIO-COMPETENTE

A bactéria *E. coli* cepa TOP10F' foi preparada segundo protocolo descrito por (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS, 1989). Uma alíquota de 10 µl do estoque em glicerol da bactéria mantida a – 20 °C, foi inoculada em 6 mL de meio LB/tet e incubada por 16 horas à 37 °C sob agitação constante (pré-inóculo). Um ml do pré-inóculo foi inoculado em 100 ml no meio LB/tet e incubado à 37 °C, sob agitação constante, durante tempo suficiente para que alcançasse a fase exponencial de crescimento ($DO_{600nm} = 0,6$). Após esse tempo, a cultura foi colocada no gelo por 15 min. As células foram coletadas por centrifugação a 4.000 x g por 6 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensado em uma solução gelada de CaCl₂ 100 mM, tamponada com HEPES 10 mM pH 7,0, em um volume final correspondente a metade do volume da cultura original. As células foram novamente coletadas por centrifugação, nas mesmas condições anteriores, ressuspensas gentilmente com a solução anterior acrescida de glicerol 10% (1/50 do volume da cultura original) e mantidas no gelo por 2 horas, sendo em seguida armazenadas a – 70 °C.

3.13 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS CÁLCIO-COMPETENTES

As reações de ligação foram incubadas com 100µL da suspensão de *E. coli* Top10F' competente, por 30 min. no gelo. Após esse período, as suspensões bacterianas foram submetidas ao choque térmico à 42°C por 1 min e imediatamente colocadas no gelo por 2 min antes da adição de 1 ml de meio LB. As células transformadas foram incubadas sob agitação constante em LB à 37°C por uma hora. Alíquotas de 100 µl e 200 µl foram espalhadas em placas contendo meio LB/Amp e incubadas à 37°C por 18 horas.

3.14 ANÁLISE DE CLONES PELA TÉCNICA DE PALITAGEM

As colônias foram removidas da placa com auxílio de palitos de dente estéreis e depositadas no fundo de tubos numerados. Cada palito foi posteriormente utilizado para inocular a colônia em LB sólido, contendo o antibiótico apropriado, em um espaço numerado correspondente ao tubo o qual a colônia havia sido depositada. A placa foi incubada a 37°C por 18 horas. A cada um dos tubos foram acrescentados 15 µl do tampão de palitagem. Os tubos foram incubados a 65°C por 10 minutos. O material foi aplicado em gel de agarose 1% a uma voltagem de aproximadamente 100 volts.

3.15 PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO EM PEQUENA ESCALA (MINIPREP)

Clones recombinantes foram cultivados em 2ml de meio LB, contendo o antibiótico apropriado, durante 16-18 horas. Uma alíquota de 1,5 ml foi então centrifugada a 12.000 x g por um minuto a temperatura ambiente. As bactérias foram lisadas usando o método descrito em (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS, 1989) e os plasmídeos recombinantes purificados de acordo com o sistema de mini preparação de plasmídeo (QIAGEN).

3.16 CONSTRUÇÃO DE INICIADORES PARA DOMÍNIOS CONSERVADOS ENTRE TOPO II DE TRIPANOSOMATÍDEOS.

Oligonucleotídeos foram sintetizados a partir de regiões conservadas das topoisomerasas das espécies de tripanosomatídeos *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei*, *Crithidia fasciculata* com o objetivo de amplificar por PCR o gene da topoll de *B.culicis* (*BcTOP2*). Os oligonucleotídeos usados estão mostrados na tabela 3.

TABELA 3 INICIADORES PARA DOMÍNIOS ENTRE TOPOII DE TRIPANOSOMATÍDEOS	
Bc1	5'GGGGGATCCATGACAGACGCTTCCAAGTATCAGAAGCTCAC3'
Bc2	5'GGGGGATCCATGACAGACGCTTCCAAGTATCAGAAACTCAC3'
Bc3	5'GGGGGATCCATGACAGACGCTTCCAAGTATAAGAAGCTCAC3'
Bc4	5'GGGGGATCCATGACAGACGCTTCCAAGTATAAGAAACTCAC3'
Bc5	5'GGGGGATCCATGCGCTTGTGCAGCACGCGCTTCATGTGCG3'
Bc6	5'AAGATCGTGGACGAAAT 3'
Bc7	5' AAGATCGTGGACGAAATTCTGCTCAA 3'
Bc8	5'GGT CGG CAC GGC TAC GG 3'
Bc9	5'CCG TAG CCG TGC CGA CC 3'
Bc10	5'AGG GTC AGT TCG GTT CTC GTC AGC A 3'
Bc11	5'TGC TGA CGA GAA CCG AAC TGA CCC T 3'
Bc12	5'TAC ATT TTC ACG AAG CT 3'
Bc13	5'AGC TTC GTG AAA ATG TA 3'
Bc14	5' CCGTTGCACAGCAGCA 3'

3.18 CLONAGEM DO FRAGMENTO DE DNA BC7-14 AMPLIFICADO DE PCR

Das reações de PCR analisadas, somente aquela que continha os iniciadores Bc7 e Bc14, resultou na amplificação de um fragmento específico denominado Bc714. O fragmento Bc714 foi então ligado ao vetor pDK-101/*Xcm* I e reação de ligação utilizada para transformar *E.coli* TOP10F' competentes pelo tratamento com CaCl₂. Após a transformação, diferentes alíquotas da cultura de bactérias transformadas foram espalhadas em placas LB/amp/IPTG/X-gal e incubadas a 37°C por 18 horas. A seleção dos clones recombinantes foi feita com a técnica de palitagem. O plasmídeo de um dos clones recombinantes, foi purificado por miniprep. O seqüenciamento das extremidades do fragmento de DNA Bc714 foi obtido como descrito no item (3.21).

3.18.1 Sub-clonagem do fragmento de DNA Bc7-14

Após a purificação, 1 µg do plasmídeo recombinante escolhido foi digerido com 20 unidades da enzima *Sal*I em um volume de 20 µl a 37°C por 2 horas . A enzima *Sal*I cliva o vetor pDK-101 apenas uma vez na região contendo os múltiplos sítios de clonagem e portanto muito próximo de uma das extremidades do fragmento de DNA clonado (inserto). O material digerido foi posteriormente submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE a 100V. Os fragmentos com peso molecular de 560pb e 630pb, resultantes da digestão do inserto foram removidos do gel com o auxílio de uma lamina de bisturi, colocados em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml e purificados com o kit QIAEXII (QIAGEN), segundo recomendações do fabricante. Os fragmentos purificados foram ligados ao vetor pBluescript (KS+) previamente digerido com a enzima *Sal*I e desfosforilado com fosfatase alcalina. A reação de ligação foi utilizada para transformar *E.coli* TOP10F' competentes pelo tratamento com CaCl₂. Após a transformação diferentes diluições das bactérias transformadas foram inoculadas em placas de Petri LB/amp/IPTG/X-gal e incubadas a 37°C por 18 horas. A seleção dos clones recombinantes foi feita com a técnica de palitagem. Os

plasmídeos dos clones recombinantes selecionados foram purificados por miniprep.

3.19 VARREDURA DA BIBLIOTECA GENÔMICA DE *B.culicis* PARA OBTENÇÃO DO GENE *BcTOP2*

3.19.1 Construção de biblioteca genômica de *B. culicis*

A biblioteca genômica foi construída segundo o método descrito por (KAYSER, MURRAY, 1985). Diferentes concentrações da enzima *Sau3AI* foram utilizadas para analisar qual a melhor quantidade (unidades) que produzia fragmentos de DNA entre 12 a 20 Kb. Para tanto, 10 µg do DNA genômico foram misturados com 10 µl de tampão 10 x da enzima *Sau3A* e ajustado com água ultrapura para o volume final de 100 µl. Foram adicionados 20 µl da mistura em um primeiro tubo (tubo 1) e 10 µl em outros oito tubos (2 a 9). Uma unidade da enzima *Sau3A* foi adicionada no tubo 1 e 10 µl da mistura foram transferidos para o tubo 2 e assim sucessivamente até o tubo 8 sendo o tubo 9 o controle não digerido. Todos os tubos foram incubados a 37°C durante uma hora. As reações foram interrompidas com EDTA na concentração final de 20 mM e submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,3% em tampão TBE a 2 volts/cm. A reação onde a maior parte do DNA estava distribuída entre 12 Kb e 20 Kb foi utilizada para definir a quantidade de enzima a ser utilizada. Foram utilizadas as condições acima para se estabelecer então a digestão de 200 µg DNA genômico com a enzima *Sau3A*. O DNA digerido foi extraído com uma solução de fenol/clorofórmio e precipitado com 0,3 M de acetato de sódio pH 6,0 e dois volumes de etanol absoluto e guardado a -20°C por 16 horas. O DNA sedimentado foi lavado duas vezes com etanol 70%, secado e posteriormente ressuspensão em 200 µl de TE. O DNA foi então depositado no topo de um gradiente de NaCl de 5 a 25% e submetido a 65.000 x g por 4,5 horas. O gradiente foi coletado em alíquotas de 250 µl. Para a análise das alíquotas em gel de agarose 25 µl foram coletados de tubos alternados, diluídos em quatro volumes de TE e analisados em gel de

agarose 0,3% em tampão TBE a 2 volts/cm durante 16 horas. As frações que continham o DNA do tamanho desejado foram adicionadas um volume de água ultra pura e 1ml de etanol absoluto. A mistura foi incubada em gelo seco por 10 minutos e centrifugada a 16.000 x g por 15 minutos. O sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70%, secado e ressuspenso em 20 µl de TE . O material foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm. Os fragmentos foram ligados ao DNA do vetor lambda EMBL3 previamente digerido com a enzima de restrição *Bam*HI. O DNA ligado foi empacotado *in vitro*, usando-se extratos de empacotamento comercial (STRATAGENE). A biblioteca foi amplificada em *E.coli* LE392.

3.19.2 Seleção dos clones da biblioteca genômica de *B. culicis* contendo sequências do gene *BcTOP2*.

Para a primeira varredura foi utilizado um total de 36.000 clones da biblioteca distribuídos em 10 placas LB/Mg. Réplicas em membranas de nitrocelulose (AMERSHAM BIOSCIENCES) dos fagos contidos nas placas foram feitas segundo o procedimento descrito por (BENTON, DAVIS, 1977), com modificações. As membranas foram cuidadosamente retiradas das placas e colocadas em solução para desnaturação por 1 minuto. Após desnaturação do DNA, os filtros foram transferidos duas vezes para uma solução de neutralização, onde permaneceram por 5 minutos. Os filtros foram então lavados em SSC 2 x por 5 minutos e secos sobre papel de filtro 3MM. O DNA foi fixado à membrana através do aquecimento em forno a 80°C durante 2 horas. As membranas contendo os ácidos nucleicos foram incubadas em solução de hibridização para *southern blot* por 1 hora a 65°C antes da adição do fragmento Bc714 marcado radioativamente por *nick-translation* (RIGBY et al., 1977) na concentração de 1×10^6 cpm.ml⁻¹ (atividade específica de 1×10^8 cpm.µg⁻¹). A incubação procedeu por mais 16 horas e então as membranas foram lavadas por 30 minutos em soluções com concentrações decrescentes de SSC a 65°C (SSC 2 x / SDS 0,1%, SSC 1 x / SDS 0,1% e SSC 0,1 x / SDS 0,1%). Em seguida, as membranas foram expostas a

filmes de raios-X (Hyperfilm, AMERSHAM BIOSCIENCES) na presença de tela intensificadora (Dupont Cronex Lighting plus) a -70°C .

As auto-radiografias foram analisadas a fim de identificar a posição dos clones nas placas de petri. Os clones foram então coletados e colocados em 200 μl de SM. Para completa purificação dos clones de interesse, ou seja, até que todas as u.f.p presentes na placa de Petri fornecerem sinais positivos para hibridização, uma segunda e uma terceira varredura foram executadas da mesma forma. Após a terceira varredura o DNA de um clone genômico foi purificado como descrito em (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS, 1989).

3.20 CLONAGEM DO GENE *BcTOP2* A PARTIR DE UM CLONE GENÔMICO

Para a clonagem de fragmentos do gene *BcTOP2* contidos no clone genômico, este foi analisado por *southern blot* para a escolha dos fragmentos a serem clonados. Para tanto, 2 μg de DNA do clone λBc1 , obtido na varredura da biblioteca genômica, foram digeridos com as enzimas *XcmI* ou *Sac II* em reações contendo 20 unidades das respectivas enzimas e tampão apropriado em um volume final de 40 μl . As reações foram incubadas a 37°C por 3 horas e submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE a 100 volts. O gel foi corado com brometo de etídio, fotografado sob luz ultravioleta (310 nm) e então o DNA foi transferido para membrana de nylon Hybond-C (AMERSHAM-PHARMACIA BIOTECH) de acordo com o protocolo descrito em (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS, 1989). Após a análise da auto-radiografia procedemos com a clonagem de alguns dos fragmentos que tiveram sinal positivo para a sonda.

3.20.1 Clonagem dos fragmentos obtidos da digestão do DNA do clone genômico com as enzimas *XcmI* e *SacII*

Oito μg de DNA do clone λBc1 foram digeridas com as enzimas *XcmI* ou *SacII* em reações contendo 60 unidades das respectivas enzimas em seu tampão, em um volume final de 40 μl . As reações foram incubadas a 37°C por 3 horas e

submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE a 100 volts. Os fragmentos de DNA que mostraram sinais positivos no *southern blot* foram removidos do gel, com o auxílio de uma lamina de bisturi, colocados em tubos de microcentrífuga e purificados com o kit QIAEXII. Os fragmentos de 1,0 Kb e de 3,0 kb resultantes da digestão com a enzima *SacI* foram ligados ao vetor pBluescript/*SacI*. Os fragmentos de 4,2 Kb, 2,5 Kb e 1,1Kb, resultantes da digestão com a enzima *XcmI* foram tratados com a enzima Klenow em reações contendo 5 unidades da enzima em seu tampão, em um volume final de 20µl. As reações foram incubadas a 37°C por 15 minutos e purificadas com o Kit QIAEXII. O material purificado foi ligado ao vetor pBluescript/*XcmI*. Células cálcio competentes *E.coli* TOP10F' foram transformadas com as reações de ligação e diferentes alíquotas das culturas de bactérias transformadas foram inoculadas em placas LB/amp/IPTG/X-gal e incubadas a 37°C por 18 horas. A seleção dos clones recombinantes foi feita com a técnica de palitagem e os clones recombinantes purificados por miniprep.

3.21 SEQUÊNCIAMENTO DO GENE *BcTOP2*

O sequenciamento dos clones contendo fragmentos do gene *BcTOP2* foi feito utilizando o Kit BigDye[™] Terminator ready Reaction Mix baseado na técnica descrita por (SANGER, NICKLEN, COULSON, 1977). As reações foram aplicadas em um seqüenciador automático de DNA, modelo 3100 Genetic analyzer da Applied Biosystems, de acordo com as instruções do fabricante.

TABELA 5 – INICIADORES UTILIZADOS NO SEQUENCIAMENTO	
SP6	5' ATTTAGGTGACACTATA 3'
T7	5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'
T3	5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3'
Bc15	5' CTTCTCATCCAGTCGCAGCCCA 3'
Bc16	5' TCTACAGCTTCAAGACTTTCACAA 3'
Bc17	5' CACGATGAGCGTGCGGATGTT 3'
Bc18	5' CAGCGCGAAGTGCACCATCTC 3'
Bc19	5' CGGCCTTTCGCGTTGTTGATGTT 3'
Bc20	5' AGGGGGAGCTCGTGCGGTGCGCT 3'
Bc22	5' GTTTCATCGCGGTGCGCAAGT 3'
Bc23	5' CTGCAAGATCGGCGAGAGGTC 3'

3.22 ANÁLISES COMPUTACIONAIS

As seqüências de nucleotídeos e as seqüências de aminoácidos deduzidos a partir destas foram analisadas utilizando-se os programas EditSeq, MapDraw, MegAlign e SeqMan (DNASTAR) bem como o algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) disponível na página da WEB do National Center for Biotechnology information – NCBI – vinculado ao National Institute of Health-NIH dos Estados Unidos da América.

Para a análise estrutural do gene *BcTOP2* foi utilizado programa Conserved Domain Search service (CD-Search) (MARCHLER-BAUER, BRYANT, 2004)

Para busca de sinais de localização celular foram utilizados os programas SignalP 3.0 (JANNICK et al., 2004) e PSORT II (NAKAI, HORTON, 1997)

3.23 CARACTERIZAÇÃO DO GENE *BcTOP2* POR *SOUTHERN BLOT*

DNA genômico de *B. culicis* (10µg) foi digerido por completo com enzimas de restrição *SalI*, *BglII*, *PstI*, *SacI* e *XhoI* em reações contendo 60 unidades das respectivas enzimas e seu tampão em um volume final de 40 µl . As reações foram incubadas a 37°C por 3 horas e submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE a 5 volts/cm. O gel foi corado com brometo de etídio e fotografado sob luz ultra violeta (310nm). O DNA foi transferido para uma membrana de nylon (Hybond-C) através de procedimento descrito por (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS, 1989) que acrescenta o tratamento com HCl ao protocolo padrão (SOUTHERN, 1975). Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de hibridização southern blot por 1 hora a 65°C antes da adição do gene *BcTOP2* marcado radioativamente por *nick-translation* (RIGBY et al., 1977) na concentração de 1×10^6 com.ml⁻¹ (atividade específica de 1×10^8 com. µg⁻¹). A incubação procedeu por mais 16 horas e então lavadas duas vezes por 15 minutos em soluções com concentrações decrescentes de SSC a 65°C (SSC 2 x / SDS 0,1%, SSC 1 x / SDS 0,1% e SSC 0,1 x / SDS 0,1%). Em seguida,

a membrana foi exposta a filme de raios-X na presença de tela intensificadora (Dupont Cronex Lighting plus) a -70°C .

3.24 ANÁLISES DA EXPRESSÃO DO GENE *BcTOP2* POR *NORTHERN BLOT*

RNA total de *B.culicis* (10 μg) foi desnaturado e separado em gel de agarose 1,2% sobre condições desnaturantes, como descrito por (LEHRACH et al., 1977). Após a separação eletroforética o gel foi lavado várias vezes com água destilada livre de RNase, para retirada do formaldeído, corado com brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta (310 nm). O RNA foi transferido do gel para uma membrana de nylon (Hybond-C) utilizando o protocolo descrito em (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS, 1989). Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de hibridização northern blot por 1 hora a 42°C antes da adição do fragmento Bc714 marcado radioativamente por *nick-translation* (RIGBY et al., 1977) na concentração de 1×10^6 com. ml^{-1} (atividade específica de 1×10^8 com. μg^{-1}). A incubação procedeu por mais 16 horas e então lavadas duas vezes por 15 minutos em soluções com concentrações decrescentes de SSC a 42°C (SSC 2 x / SDS 0,1%, SSC 1 x / SDS 0,1% e SSC 0,5 x / SDS 0,1%). Em seguida, a membrana foi exposta a filme de raios-X na presença de tela intensificadora (Dupont Cronex Lighting plus) a -70°C .

3.25 EXPRESSÃO DA REGIÃO CARBOXI-TERMINAL DE *BcTOPOII* FUSIONADA A GFP

O gene da GFP foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo pEGFP-C3 utilizando os iniciadores (5' GGGGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC 3') e (5'GGTGGATGGATCCCCCGCGGTACTTACGACTGC 3') ambos contendo sítio para a enzimas de restrição *Bam*HI. A condição da reação de PCR foi seguida segundo item (3,16). O produto amplificado foi purificado com o sistema High Pure PCR Purification Kit (ROCHE) e digerido com a enzima *Bam*HI (20 unidades da enzima em um volume de reação de 20 μl , contendo 500 ng do gene GFP

amplificado por PCR). Em seguida este material purificado usando o sistema High Pure PCR Purification kit. O gene da GFP foi ligado ao vetor pQE8/*Bam*HI/CIP (relação molar de 3:1) e a reação de ligação utilizada para transformar *E.coli* TOP10F' competentes pelo tratamento com CaCl₂. A seleção dos clones recombinantes foi feita com a técnica de palitagem e a orientação do inserto nos clones recombinantes foi verificada por PCR utilizando os iniciadores RBS (5' CCGAAAAGTGCCACCTG 3') e (5' ATGGTAAGCTTAAACGCAGACAAGGTCTATCCCG 3'). Um dos clones selecionados denominado pQEGFP foi purificado por miniprep e digerido com as enzimas *Sac*I e *Hind*III. A porção carboxi-terminal de *Bc*TOP2 foi amplificada por PCR a partir do DNA genômico de *B. culicis* utilizando os iniciadores Bc20 (5' AGGGGGAGCTCGTGCGGTCGCT 3') e BcHindIII (5' ATGGTAAGCTTAAACGCAGACAAGGTCTATCCCG 3') que contem o sitio para a enzimas de restrição *Sac*I e *Hind*III respectivamente. A condições da reação de PCR foram seguidas segundo item 3.17. O produto amplificado foi purificado com o sistema High Pure PCR Purification KiT (ROCHE) e digerido com as enzimas *Sac*I e *Hind*III. Em seguida este material foi ligado ao vetor pQEGFP digerido com as respectivas enzimas e a reação de ligação utilizada para transformar *E.coli* TOP10F' competentes pelo tratamento com CaCl₂. A seleção dos clones recombinantes foi feita com a técnica de palitagem . Um dos clones selecionados denominado pGFPCTOP foi purificado por mini-prep e seqüenciado com os primers Bc20 e BcHindIII.

3.25.1 Indução da expressão da região carboxi-terminal de BcTOPOII fusionada a GFP

Uma colônia do clone pGFPCTOP foi inoculada em um tubo contendo 2 ml de meio LB (amp/cana) e incubada a 37°C por 18 horas sob agitação. Um volume de 200 µl desta cultura foi transferido para outro tubo contendo 2 ml do mesmo meio . A cultura foi incubada sob agitação constante a 37°C por 1 hora. IPTG foi adicionado a cultura na concentração final de 2 mM e a incubação

prosseguiu por mais 3 horas nas mesmas condições . Um controle negativo foi feito como descrito a cima, com a exceção que na cultura controle não foi adicionado IPTG. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 4.000 g por 10 minutos a 4°C e lavadas em PBS. O sedimento bacteriano foi ressuspenso em 75 µl de PBS, seguido da adição de 25 µl de tampão de amostra 4x. As amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos e alíquotas de cada amostra foram submetidos à eletroforese em gel SDS-PAGE 10%, como descrito por (LAEMMLI, 1970). O gel foi corado com coomasie-blue R-250 a 65°C por 5 minutos e descorado com trocas sucessivas de solução de descoloração na mesma temperatura.

3.25.2 Purificação da proteína de fusão GFPCTOP

Um clone expressando o fragmento carboxi-terminal do gene *BcTOP2* fusionado a GFP foi cultivado em 200 ml de meio LB/amp e induzido como descrito anteriormente. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos a 4°C e lavadas em PBS. O sedimento foi ressuspenso em 4 ml de tampão PBS e sonificado (Ultrasonic homogeizer, Cole-Parmer) com 4 pulsos de 15 segundos na potência 7. Em seguida o material foi centrifugado a 20,000 x g por 30 minutos a 4 °C . O sobrenadante foi coletado e encubado com 400 µl de resina níquel-NTA por 2 horas a 4 °C e sobre leve agitação. A resina foi lavada por duas vezes com 50 ml de tampão de lavagem e posteriormente eluída em 1 ml de tampão de eluição.

3.26 EXPRESSÃO DA REGIÃO CODIFICANTE DO GENE *BcTOP2* EM *E.coli*

O gene *BcTOP2* foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores BcBamHI (5'TGAC**GGATCC**ATGACGGACCCCAGCA3') e BcHindIII (5' ATGGT**AAGCTT**AAACGCAGACAAGGTCTATCCCG 3') contendo sitio para as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III respectivamente (em negrito). Para tanto 10 pmol de cada iniciador foram misturados com 100 ng do DNA total de *B. culicis*,

200 μM de dNTPs, tampão para Taq DNA polimerase, 2 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). O PCR se iniciou com uma etapa de desnaturação do DNA a 94°C durante 3 minutos. Subseqüentemente foram realizados 35 ciclos com as etapas de desnaturação (92°C por 30 segundos), hibridação dos iniciadores a seqüência alvo (55°C por 30 segundos) e alongamento da cadeia de DNA pela polimerase (72°C por 3 minutos). Uma alíquota de 10 μl do DNA amplificado foi analisada em gel de agarose 0,8%. O produto amplificado, um fragmento de 3,6 Kb, foi purificado com sistema High Pure PCR Purification Kit (ROCHE) e digerido com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III utilizando 60 unidades de cada enzima em tampão apropriado. O produto digerido foi ligado ao vetor pQE30/*Bam*HI/*Hind*III e reação de ligação utilizada para transformar *E.coli* TOP10F' competentes pelo tratamento com CaCl_2 . Após a transformação diferentes alíquotas da cultura de bactérias transformadas foram inoculadas em placas LB/amp/ e incubadas a 37°C por 18 horas. A seleção dos clones recombinantes foi feita com a técnica de palitagem. Um clone selecionado foi purificado por miniprep e utilizado para transformar *E.coli* M15. As bactérias transformadas foram espalhadas em placas LB amp/cana e incubadas a 37°C durante 16 horas.

3.27 OBTENÇÃO DE ANTISORO POLICLONAL CONTRA BcTOPOII

A proteína recombinante (BcTOPOII) após purificada será usada para inocular coelhos New Zeland por via sub-cutânea, com 3 aplicações de aproximadamente 50-100 μg de antígeno em intervalos de 15 dias, seguida de obtenção do soro após 2 semanas da última inoculação. O antígeno será emulsificado em adjuvante completo de Freund, na primeira inoculação, e em adjuvante incompleto nas duas finais.

3.28 ESTUDO DA EXPRESSÃO DE TOPOII POR WESTERN BLOT

Amostras contendo extratos de *B.culicis*, *C.fasciculata* ou *T.cruzi*, equivalentes a 1×10^7 células, bem como extratos de *E.coli* expressando ou não a

BcTOPOII recombinante foram resolvidos em SDS-PAGE 8% e transferidas para filtro de nitrocelulose (BIORAD®) segundo protocolo descrito por (TOWBIN et al., 1979). Após a transferência a membrana foi incubada em tampão de bloqueio, à temperatura ambiente por meia hora. Após a incubação, a membrana foi transferida para a solução de bloqueio contendo soro policlonal na diluição de 1:250 (soro GFPCTOP) por uma hora a 37°C. Posteriormente foi lavada por 3 vezes, com PBS/Tween gelado com intervalos de 5 minutos entre cada lavagem. A membrana foi então incubada em PBS/Tween contendo anticorpos de cabra anti-IgGs de coelho conjugado com a enzima fosfatase alcalina (PROMEGA) na diluição de 1:7500 durante 30 minutos a 37°C. A membrana foi lavada por 3 vezes com PBS/Tween gelado e revelada com 66µl de NBT 50 µg/ml (PROMEGA) e 33 µl de BCIP 50 µg/ml (PROMEGA) em 10 ml de tampão da fosfatase alcalina. A revelação foi interrompida por lavagens em água ultrapura.

3.29 LOCALIZAÇÃO CELULAR DA TOPOII DE *B.culicis*

3.29.1 Imunolocalização por microscopia óptica

Para os ensaios de imunofluorescência, os protozoários foram cultivados em meio apropriado até a concentração de $1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$. Os protozoários foram coletados por centrifugação a $5000 \times g$ por 10 minutos, lavada em PBS, e novamente coletados por centrifugação sobre as mesmas condições. As células foram então ressuspensas em uma concentração final de 5×10^6 células ml^{-1} e depositadas em lamínula tratada com poli-L-lisina 0,01% diluída em PBS 1x. O material foi fixado em paraformaldeído 4% diluído em PBS 1x durante 5 minutos e a fixação foi interrompida por duas lavagens com glicina 0,1 M por 3 minutos. A lamínula foi então lavada por duas vezes com PBS 1x durante 5 minutos e incubada com Triton X-100 0,08% diluído em PBS 1x por 5 minutos. A lamínula foi novamente lavada por duas vezes com PBS 1x durante 5 minutos, incubada em tampão de bloqueio por 30 minutos e, em seguida, incubada com soro policlonal GFPCTOP diluído 1:40 em tampão de bloqueio por 1 hora. Posteriormente a lamínula foi lavada 3 vezes por 5 minutos com PBS 1x e incubadas com anti-IgG

de coelho conjugado a FITC (SIGMA) diluído 1:400 em tampão de bloqueio por 30 minutos. Após este tempo a lamínula foi incubada com iodeto de propídio $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ em PBS por 5 minutos, lavada três vezes em PBS 1x por 5 minutos e montadas com n-propil-galato sobre uma lâmina.

3.29.2 Imunolocalização de BcTOPOII por microscopia eletrônica de transmissão

3.29.2.1 Processamento de *B.culicis* para imunocitoquímica

As células foram fixadas em tampão de fixação por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida as células foram lavadas no mesmo tampão, seguindo-se a desidratação em graus decrescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, a 4°C e 2 vezes em etanol absoluto a -20°C) por uma hora em cada etapa. As amostras foram mantidas a -20°C em uma solução contendo 1 volume de resina e 2 volumes de etanol absoluto. Em seguida as amostras foram encubadas em uma solução contendo dois volumes de resina e um volume de etanol absoluto por 16 horas. Após este tempo o material foi colocado em resina pura e polimerizado por 2 dias a -20°C , sob radiação ultravioleta. Cortes ultrafinos foram obtidos em um ultramicrótomo Reichert OM U3 e recolhidos em grades de níquel revestidas com Formvar e evaporadas com carbono.

3.29.2.2 Imunocitoquímica para microscopia eletrônica

As grades contendo os cortes foram seqüencialmente encubadas em: NH_4Cl 50mM diluído em PBS por 30 minutos; BSA 3% diluído em PBS por 20 minutos e em tampão de bloqueio por 20 minutos. Em seguida o material foi incubado com o antisoro GFPCTOP diluído 1:100 em tampão de bloqueio por uma hora. Posteriormente, as amostras foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com tampão de bloqueio e incubadas com anti-IgG de coelho acoplado a partículas de ouro coloidal de 10nm diluído 1:200 em tampão de bloqueio por 30 minutos. Após a incubação com os anticorpos, os cortes foram lavados com tampão de bloqueio e depois em água tridestilada. As grades foram contrastadas em acetato de urila e

citrato de chumbo. O material foi lavado com água tridestilada e guardado em ambiente seco com sílica gel.

4 RESULTADOS

4.1 ISOLAMENTO DO GENE *BcTOP2*

A partir de regiões conservadas de genes *TOP2* de diversos tripanosomatídeos, incluindo *T. cruzi*, *T. brucei*, *C. fasciculata*, *L. donovani*, construímos diversos iniciadores com o propósito de amplificar pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), fragmentos do gene *TOP2* de *B. culicis*. Das diversas combinações de iniciadores usados nas reações de PCR, apenas aquela contendo os iniciadores Bc7 e Bc14, resultou na amplificação de um fragmento de DNA específico com 2,3 Kb, denominado Bc7-14. O fragmento Bc7-14 foi clonado no vetor pDK-101/*Xcml*, que tem como característica a presença de um resíduo de timina desapareado em cada extremidade 5'. Esta característica permite a clonagem de fragmentos de DNA amplificados por PCR quando se utiliza a enzima Taq DNA polimerase, uma vez que esta tem a capacidade de adicionar resíduo extra de adenina nas extremidades 3' do produto amplificado. Após a transformação em *E. coli*, nós obtivemos dois clones recombinantes BcTOP714-26 e BcTOP714-28. Procedemos com o sequenciamento parcial do clone recombinante BcTOP714-26 utilizando os iniciadores SP6 e T7. As seqüências obtidas apresentaram uma alta similaridade com genes *top2* de tripanosomatídeos, confirmando que o produto clonado era um fragmento do gene *TOP2* de *B. culicis*. A fim de obtermos fragmentos menores do fragmento Bc7-14, para facilitar a determinação de sua seqüência, o plasmídeo do clone BcTOP714-26 foi digerido com diversas enzimas de restrição que possuem sitio único no vetor pDK-101. A enzima de restrição *SaI* gerou um perfil de restrição pouco complexo e os fragmentos gerados com peso molecular de 0,5 Kb e 0,6 Kb foram clonados no vetor pBluescript(KS+).

Após a seleção dos clones recombinantes, dois deles, denominados TOPSAL6 (0,6 kb) e TOPSAL5 (0,5 kb) foram seqüenciados com os iniciadores T3 e T7. As seqüências obtidas foram alinhadas com as seqüências do clone BcTOP714-26. A seqüência do clone BcTOP714-26, obtida com o iniciador SP6 apresentou sobreposição com as seqüências do clone TOPSAL6, sendo que as seqüências do clone TOPSAL5 não apresentaram sobreposição. Para analisarmos o posicionamento do clone TOPSAL5 no clone BcTOP714-26, com a finalidade de escolher uma estratégia para o sequenciamento completo do clone BcTOP714, alinhamos as seqüências dos clones BcTOP714-26, TOPSAL6 e TOPSAL5 com a seqüência do gene *TOP2* de *Crithidia fasciculata* (*CfTOP2*).

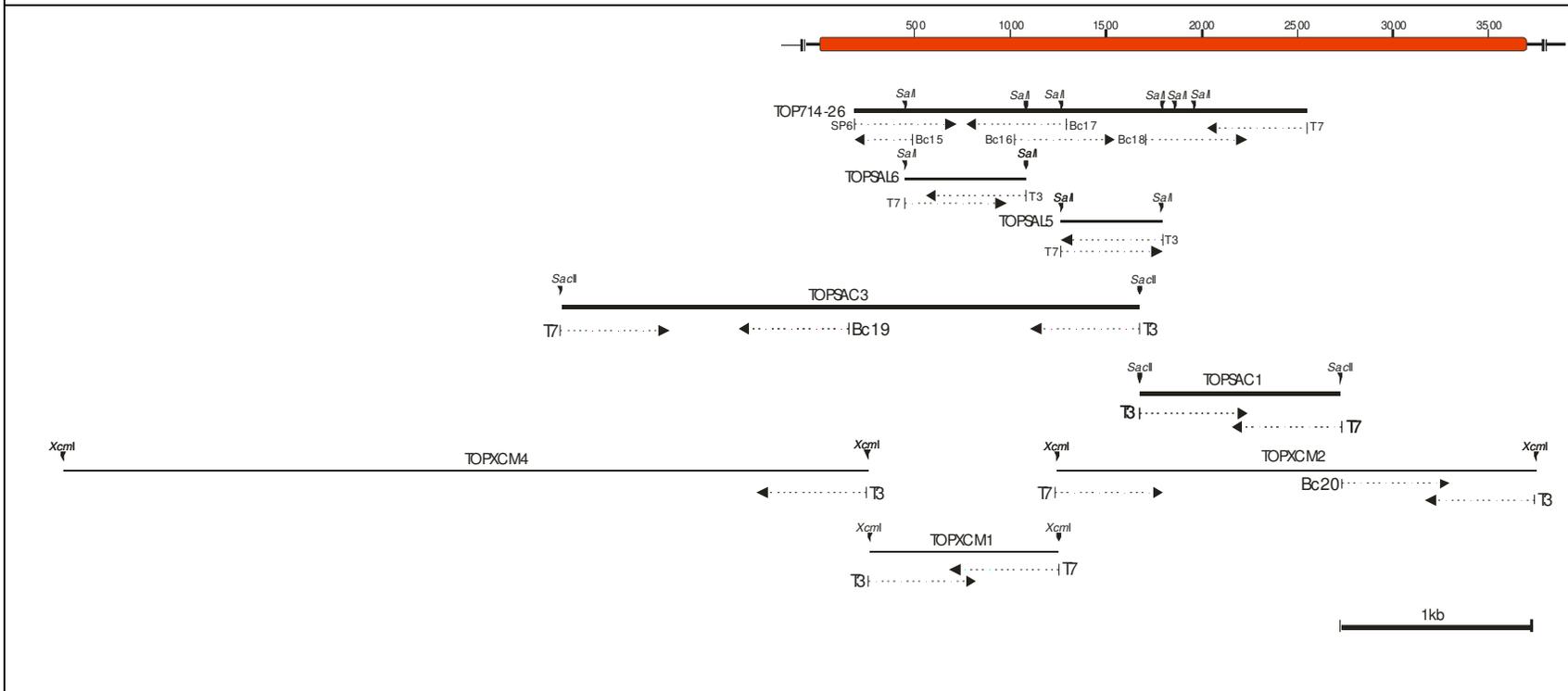
A partir destas análises desenhamos os iniciadores Bc15, Bc16, Bc17, Bc18 (tabela) que foram utilizados para completar o sequenciamento do clone BcTOP714-26. A seqüência completa do clone BcTOP714-26 quando comparada com seqüência do gene *CfTOP2* mostrou conter cerca de $\frac{3}{4}$ do gene a partir da extremidade 5'. Para obtenção do restante da região codificante do gene *BcTOP2*, foi construída uma biblioteca genômica de *B. culicis* no vetor λ EMBL3. Para a seleção de clones contendo o gene *BcTOP2*, foi feita uma varredura de 36.000 clones da biblioteca genômica, utilizando como sonda o fragmento Bc7-14. A partir dessa varredura foram obtidos três clones. Um dos clones foi isolado e denominado λ Bc1.

Para sub-clonar fragmentos do gene *BcTOP2* contidos no clone λ Bc1, o DNA desse clone foi digerido com as enzimas, *XcmI* e *SacII* e analisado por *southern blot* utilizando como sonda o fragmento Bc7-14. Dois fragmentos, um de 3,0 Kb e outro de 1,0 kb, gerados pela digestão do clone λ Bc1 com a enzima *SacII*, foram positivos para a sonda Bc714. Estes fragmentos foram clonados no vetor pBluescript(SK+). Após a seleção dos clones recombinantes, dois deles, denominados TOPSAC1 (1,0 Kb) e TOPSAC3 (3,0 kb) foram seqüenciados com os iniciadores T3 e T7. O clone λ Bc1 também foi digerido com a enzima *XcmI* e os fragmentos de 4,2 Kb, 2,5 e 1,1Kb, positivos para a sonda Bc714 (fig), foram clonados em pBluescript(SK+). Os clones recombinantes obtidos e denominados de TOPXCM4 (4,2 kb), TOPXCM2 (2,5 kb) e TOPXCM1 (1,1 kb) foram

sequenciados parcialmente com os primers T3 e T7. Para o sequenciamento de uma região mais interna do clone TOPXCM2 (2,5 kb) utilizamos o primer Bc20 que foi desenhado com base na seqüência do clone TOPSAC1.

Após o alinhamento da seqüência dos clones foi possível encontrar uma fase de leitura de 3693 pb (numero de acesso no GenBank [AY185495](#)), codificando uma proteína com 1.230 aminoácidos e com uma massa molecular calculada de 138 kDa.

FIGURA 5 - RESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRATÉGIA DE SEQÜENCIAMENTO DO GENE *BcTOP2*



NOTA: A barra vermelha representa o quadro aberto de leitura do gene *BcTOP2* . As setas indicam as regiões seqüenciadas nos respectivos clones.

FIGURA 6 - SEQUENCIA DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS DO GENE *BcTOP2*

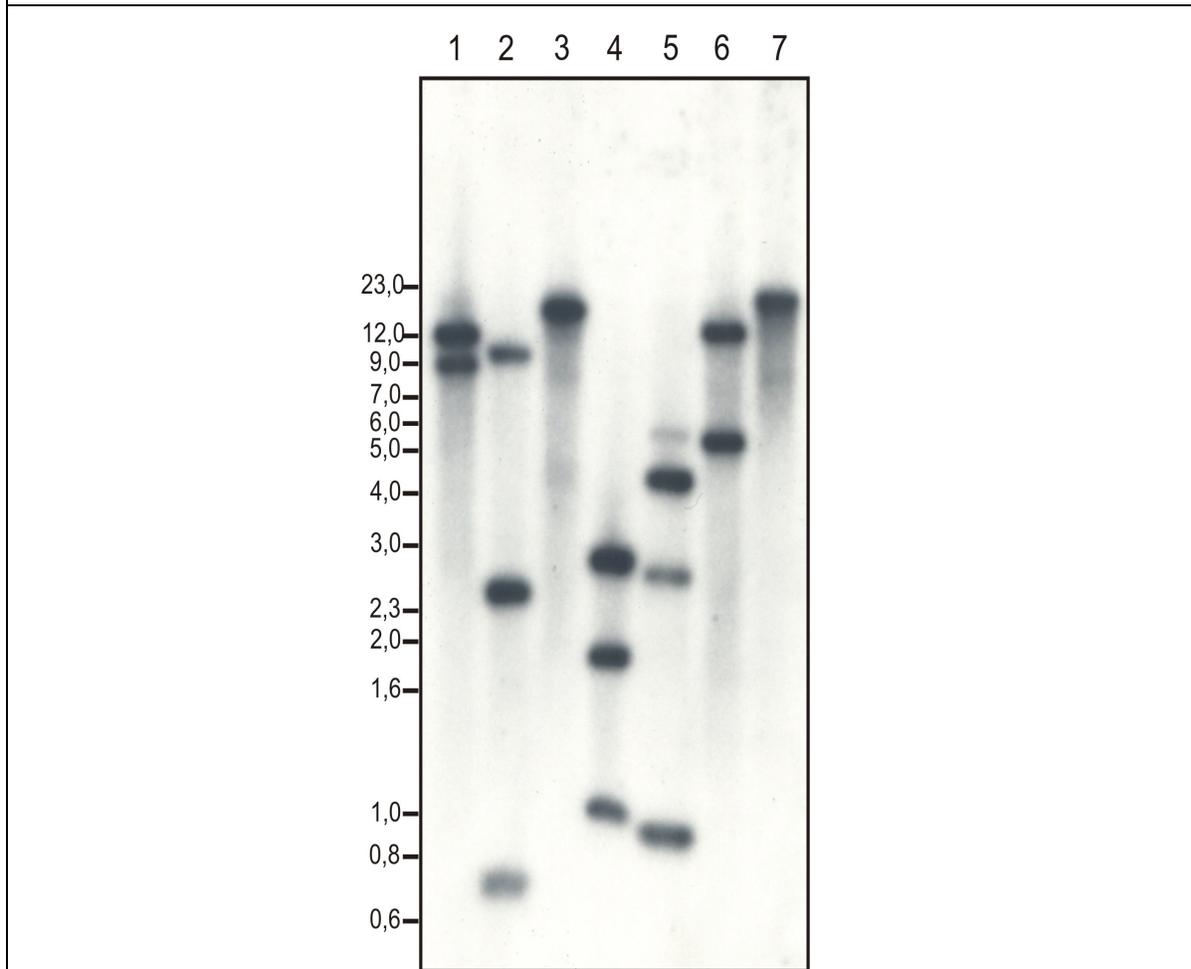
A TGA CCGAC CCGA GCAAGTA TAA GAAGT TGTCG CCA TCGA CCA TGTC C TGC TGC GGC GGA GA TG TAC GTGGGCA GCA TCGA GA CCGAC CCGG TGTC 1 00
 H T D P B K Y K K L B P I D H Y L L R P E H Y Y G B I E T Q P Y B
 TG TCG TGT TCGA TCC TGTC AAGGCC TCGA TGCG GTGGGAG TCCA TGC AGGTGAA CCA C GGC C TGC TGAAGA TCGTGGAC GAAA TTC C TGC TEAA C TCGT 2 00
 H F Y F D P Y K A C H A W E B H Q Y N H G L L K I Y D E I P A Q L Y
 GGA TAA CA TCAACAA C GCGA AAGCGCGCG TAA GA TGA C C T TCA T TAA GA TEACCA TGTCGGAC C TGGGCGA GA TCA CCA TTGA GAA TGA CCGC GCGGGT 3 00
 D N I N N A K G R R R K H T F I K I T H B D L G E I T I E N D G A G
 AT TCCA TC GTGAAGA ACAA GGA GCA CAAAA TA TACA TCCC CGA GA TGGTGT TCGGGEA CC TCC TCA C GAGC TCCAAC TA CGA CAA C GAC GAGA GE TCGA 4 00
 I P I Y K N K E H K I Y I P E H Y F G H L L T B B N Y D N D E B B
 CGA CCGCGCGCGCGGA CCGC TAC CCGCGCAAGC TCA C GAA C A TCC TGTCGAC CCA A TTC TCGGTGC TC TCGCGAC CCGAGGGGAA CCGAGT TCGCA TGA G 5 00
 T T A G R H G Y G A K L T N I L B T Q F B Y L C R T E G K E F R H B
 C TGGAC GGA CCA C TCGCGCA ACGCCAC CCGC GCGCGCGC GTC TCA TCGTGC GCA C AAGCGGGA GA GCAA CC TCA C CCGCA TCAAGT TCA TCGC C GAC TAC CCG 6 00
 W T D H H R K A T A P R Y B B C D K A E B N L T R I K F H P D Y A
 CA C T T C GGC T TCAAGA ACAA CCA GA TC TCGC TCGACA TGA C GCGGTGC TCGACA ACGCGCA T T TGGAC C TCGCGCGA TGTTCC C C TCGA TCAAGG TGA 7 00
 H F G F K N N Q I G L D H K R Y L H K R I H D L A A H F P B I Q Y
 GCA TCAACCGCGTCC C TTC CCGC T TCAAGTCC T TCGA C GAC TAC CCGCGCGC TC TAC TCGA TC CCGA GE TCGGA CCGCCAGC TA CCGC CCAAGCC C T TCGT 8 00
 B I N G Y P F A F K B F D D Y A G L Y B I P B B D G Q L P P K P F Y
 GCA CAA CAGCGCA C CCGCA GCA TCGC C T T TCGTCC TCGC TCAACCGA CCGCGCGAAGC GCA TC T TCGCGGTGTG TGAACCGCGC TCGTCA C GCA CAA C CCGC 9 00
 H N B R N G B I A F Y P Q L N A G A K R I F G Y Y N G Y Y T H N G
 GGCACCGCA T TGAACCGCGCGC C TCGCA C CCGGAC CCGC TCGAC CCGC TC TCCCGCAC CCGC TCAAGAA GGA CCGGAA CCGTGGTGGAC CCGCA C CCGC 1 000
 G T H E N A A B D I L T G T L D A L B R T L K K D G K Y Y D A N R
 TGA TCG CCGAC T TCA C T T C TCGC T TCC TCA TCCA C TCGCA CCGCA CCGT TCGA C TCGCA GCA C ACGCGCGC TCGT G TCGAC CCG TCA CCA TCGC GCG 1 100
 Y H R H F T I L Y F L I Q B Q P K F D B Q B K A R L Y B T Y T H P R
 CG TCGC GAA CCGCG CAGC TCGA C CAGTAC C TCC TCCA TCG C C T TCC TCGA CCGCGCAC C TGAAC C TCA TCGT CCGAC CAGA TCGC CCGC GGAAC TGAAC CAG 1 200
 Y P K G E L E Q Y L B B H P F L E A H Y N B H B D Q I A A E L N K
 GAAA TGGGC CCGCGCAAGC TCGC TCGA C CAGTCC C TCA TC TC C TCCA TCA CCAAGC TGGT C GAC CCGAC C TCA CAA CCA CCA CCGC GGA C CCGA CCA CCA CCGC 1 300
 E H G A G K L L B B K B L I B B I T K L Y D A T G N K B D G K N I
 GCA CCGC TCA TCGTCA C CCGA CCGCGC C TCGC CCGCA CCGC CCGC TCGA C CCAAC CCGC TC TCGA C GCA TCA CAGC CCGC TTC TCGTGGTGC T TCC CCGC TCGC CCG 1 400
 R T L I Y T E G D B A K A L A L N B L B B D Q K R F C G Y F P L R G
 CAAA C TCGC TCAAC C TCGCGCA CCA CCA CCA CCGC TGAACCGCGC TCAAGA C TCGCAAGGAGC TCGA CCGA CCGC TCGTCC C TCGC CCGC CCGCGC TCGA C CCGC CAGC CCG 1 500
 K L L N Y R N N N L K R L K N C K E L Q D L F L A L G L E L G K T
 TA CCGGAC C TCAAC CAGC TCGCGC TCA C CCGCGC TCGC TCA C TGA CCGGAC C CCGA CCGC GGA CCGC TCGCA CCA CCGG C TCGTCA TCAAC CCGC TCG 1 600
 Y R B L N E L R Y Q R L L T H T D Q D A D G B H I K G L Y I N A F
 AG TCGC TCGTGGC CCGA CCGC TCGC TCGA C CCGC TACA TC TCGC TC TTC TC CAC CCGCA CCGC TGAAGA CCGC CCGCGCGGGA CCGA CCA CCGA CCGT 1 700
 E B L W P E L L Q R H Q G Y I B L F B T P I Y K I R P R G K N Q D Y
 GC TCGC C TTC TACA CCGC T TCA CCGGAC T TCA CCAAG TCGCAGC CCGCGCA CCGC 1 800
 L B F Y B F K D F H K W Q R A H P N Y N Y T A K Y Y K B L G T B T
 AC CCGCGGAC CCGGTA C CCGGTA C TTC TCCAAC C TGGAGC CAGAA CCA TCA TGAAGC TCGA CCGT CCGA CCGGAA CCGC CCAAGC TCGC TCGA C CCGC TCGA C T 1 900
 T A E G K E Y F B N H E Q N I H K L Q Y D P K D H K L L D B Y F D
 C TCA CCGA CCGC TCGA C TCGCGC CCGA CCGC TCGA TGA C GAA CCGCGA C CCGC T TCA C CCGCGC CCGC TCGA C TCGA CCGC CCGA CCGA CCGC CCGC 2 000
 B Q E Y E W R K D W H T K A N A F N G D Y D I D R B K K Y L B I P D
 C T T TCGTCA CCAAGGAG TGG TCGAC T TCGC CCGC 2 100
 F Y H K E M Y H F A L A G N A R A I A H B Y D G L K P B Q R K I L
 TGGCGC TC T TCAAGC CCGCGCA CCGCGGAG CCGCGCA CCGGTC CCGC 2 200
 W A L F K R G K A E B A K Y A Q L B G Y I B E Y B B F H H G E M B
 TC CAGGAG CCA CCGC TCGAAGA TCGCGCAGAC T TCA C CCGC 2 300
 L Q E T I Y K M A Q N F T G G N N I N L L Y P E G Q F G B R Q Q L G
 TA CCA CCA CCGC CCGC CCGC CCGC TACA TC T TCA CCAAGC TC TCGC CCGC T TCGCGC CCGC CCGC TC T TCC CCGA CCGC CCGC CCGC CCGC CCGC CCGC 2 400
 N D H A A P R Y I F T K L B R F A R Y L F P P E D D E P L L D Y T E
 GA CCGA CCGC CCA CCGA CCGC 2 500
 E E G T T T E P N H Y Y P I I P M L L C N G B Y G I G F G F A B N
 TC CCGC 2 600
 I P B Y H P L D Y B A Y Y R B H I N G E T A K Q Y Y K R L Y P W A Y
 CCGC T TCCA CCGC 2 700
 G F Q G I Y R R G P E G E F I A Y G K Y B A Y K N N Y I H Y B E L
 CC CCGA CCGC CCGA CCGA CCGA CCGC 2 800
 P W T T B I E A F R G H I B N L A N H D Y Y Q R I A D Y B G A N H
 TC GACA T TGA TC TCA TCGTGC CCGA CCGC 2 900
 I D I D L I Y R E G B Y T T V B E Y E A D L A L B Q K I Y I N G T Y

CTTCGEEGAGEGGEACGCTEGCGEECTEGAGGGECACTTEGEEGATETTGEEGAGGEEACTAEGAECEGCEGGE TGAACE TGTA EAA GAA GEGGEGE 3000
 F B P B G Y L A P L E G D L B P I L Q R H Y D R R L N L Y K K R R
 GE GCGGEEAGE TGGGGE TGE TGGAGAE GAE E TTGEE TGEETEGA GTCEACGE GCAA GTTEGTGA TGEAC TTECGGEAAGGEEAA GA TE GAE TTCA TGA EEG 3100
 A R Q L G L L E H D L A C L E B T R K F Y H H F R Q G K I D F H T
 CAACAGACGAGAC GE TGEAGAAAGGTGTGEGACEGEE TGEACE TGEAGAAAGGTGGA EGCEAAG TAE GAE TACA TCE TGAAGAA GEECA TEACE TTETTEAC 3200
 A T D E T L Q K Y E D R L H L Q K Y D A K Y D Y I L K K P I T F F T
 CA GGAEGAA TACEACEAAGE TGGACGA EGA CA TEAA GAA GE TGEAGGA EAGCA TE GAGGAAA TGAAGAA GAE GAE GEECA EGAAGA TGTGGE TGECE GAG 3300
 R T N T T K L D D D I K K L Q D B I E E H K K T T P T K H W L R E
 CTGGAC CAG TTEGA TAA GE TGTTEGAGGAG TAE GAGE GEGTGE TEAA CAAC TCCA TCCA GAA GGAGA TGECEGA EA AGA TGECECGGTAA GGGGGAGE TCG 3400
 L D Q F D K L F E E Y E R Y L N N B I Q K E H R D K H P G K G E L
 TGE GGTGE TGEA GGE CEEC GAGA TEGAGE TGGAGGTGTGAA GGGEG TGAAGGA GECE CEEA TGE GEA TEEA GGE E TAC EAGEAG TGECECE GEE GEE 3500
 Y R B L Q A P E I E L E Y L K G Y K E R P H R I Q A Y Q H Y P P P P
 GA GCAA GEGCAA GEEGEEAGGA TGGGA TGGAGGGEGGEGGEEGE GEGEACE GTGGEAA GEGEE TGECEAAC GTAAAGGGGAA GE TGAAGGGEEAAG 3600
 B K R K P Q D G H E G G G G A A R T Y G K R L R N Y K G K L K G K
 AA GAE GEGGEECE GTGEGAE GEGEA TGGTE TTEGAE TTEGTGGGEEA TEAGE TGEAGEGEGTCE TGECE TACE TGE EGECE TTECT TTE TAG 3683
 K T R R R A T R H Y F D F Y G N Q L Q R Y L P Y L P R F L F .

4.2 ANALISE DO GENE *BcTOP2* POR *SOUTHERN BLOT*

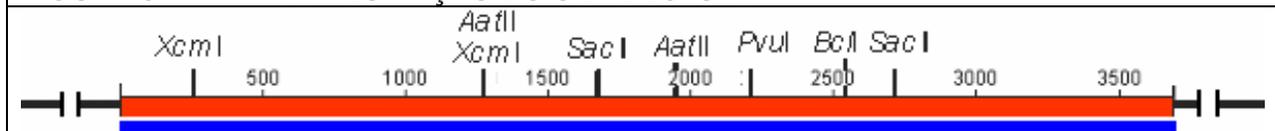
A análise do gene *BcTOP2* por *Southern blot*, mostrou um padrão simples. Para a digestão com as enzimas *DraI* e *Clal*, que não possuem sítio de clivagem dentro da sonda, foi observado uma banda para cada enzima. Para as digestões com as enzimas *BclI*, *AatI* e *PvuI*, as quais possuem um sítio de clivagem dentro da sonda, foram observadas duas bandas para cada enzima. Para as digestões com as enzimas *SacII* e *XcmI*, as quais possuem dois sítios de clivagem dentro da sonda, foram observadas três bandas para cada enzima. Estes resultados sugerem fortemente que *BcTOP2* é um gene de cópia única.

FIGURA 7- ANÁLISE DA ORGANIZAÇÃO DO GENE *BCTOP2* POR ENSAIO DO TIPO *SOUTHERN BLOT*.



NOTA: O DNA genômico de *B.culicis* foi digerido com as (1)*Bcl*, (2)*Aat*II, (3)*Dra*I, (4)*Sac*I, (5)*Xcm*I, (6)*Pvu*I, (7)*Cla*I. Após eletroforese em gel de agarose 0,8% e transferência para filtro de nylon, o material foi hibridizado com gene *Bctop2*, marcado radioativamente por *nick translation*. Os números a direita da figura representam os tamanhos das bandas do marcador de peso molecular (DNA ladder 1kb plus e DNA do fago λ digerido com a enzima de restrição *Hind*III).

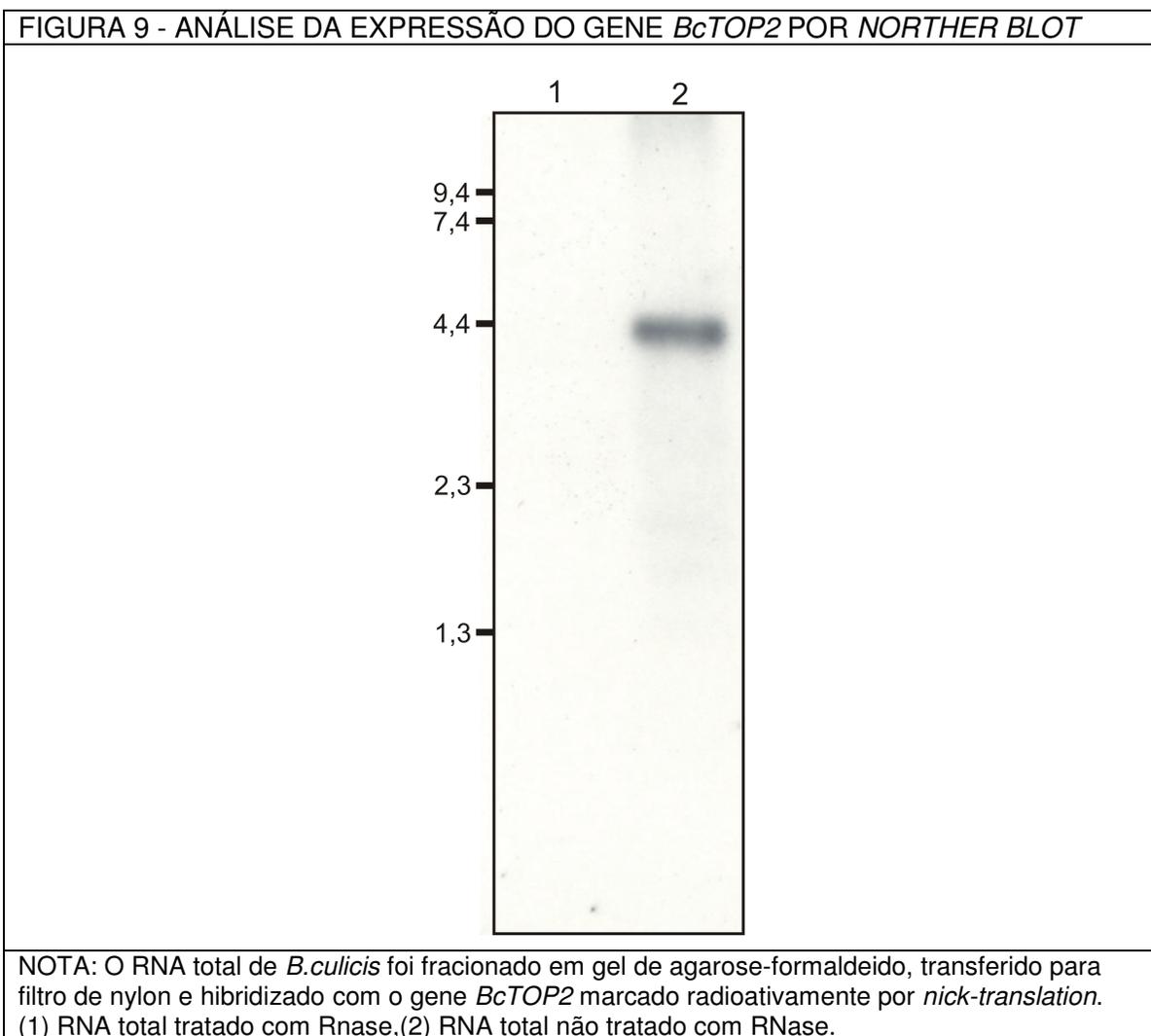
FIGURA 8 - MAPA DE RESTRIÇÃO DO GENE *BcTOP2*



NOTA: Mapa de restrição do gene *BcTOP2* (barra vermelha) mostrando os sítios de restrição das enzimas *Bcl*, *Aat*I, *Sac*I, *Xcm*I, *Pvu*I e a região utilizada como sonda (barra azul). As enzimas *Cla*I e *Dra*I não possuem sítios de restrição dentro da região utilizada como sonda.

4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *BcTOP2* POR *NORTHER BLOT*

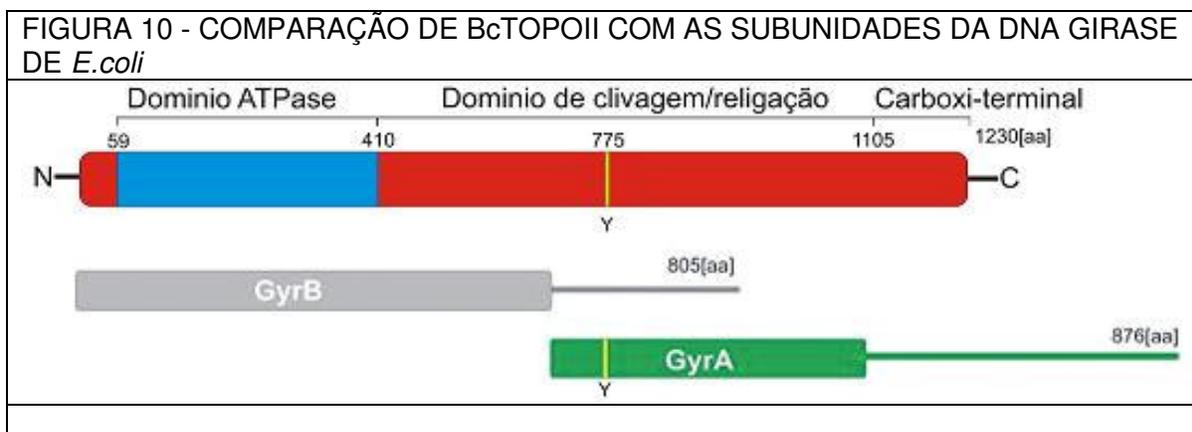
O fragmento Bc714 de 2,3 Kb foi utilizado para analisar a expressão do gene *BcTOP2* por *northern blot*. Essa análise mostrou que *BcTOP2* origina um único transcrito de 4,4 Kb. O tamanho deste transcrito é compatível com a maior fase de leitura do gene *BcTOP2* (3,6 Kb).



4.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DO GENE *BcTOP2*

A Análise da seqüência de aminoácidos do gene *BcTOP2* mostrou importantes domínios funcionais conservados entre as DNA topoisomerases do tipo II, sugeridos principalmente pela comparação com a DNA girase de *E.coli*, subunidades A e B (FIGURA 10) (SWANBERG, WANG, 1987).

A porção amino-terminal da BcTOPOII é homóloga a subunidade B responsável pela atividade ATPásica desta enzima. A porção central de BcTOPOII apresenta homologia com a subunidade A da DNA girase, sendo esta homologia restrita a porção amino-terminal. Dentro desta porção é possível alinharmos o resíduo de tirosina responsável pela ligação covalente da girase (HOROWITZ, WANG, 1987) com o resíduo de tirosina (Tyr⁷⁷⁵) na topo II de *B.culicis*.



A seqüência de BcTOPO II foi também analisada em busca de sinais de endereçamento celular para o núcleo e/ou mitocôndria. Encontramos na região carboxi-terminal da TOPOII de *B. culicis* a seqüência de endereçamento nuclear (1169-**KRKPQ** [14X] **KRLRNVKGLKGGKTRR** 1205).

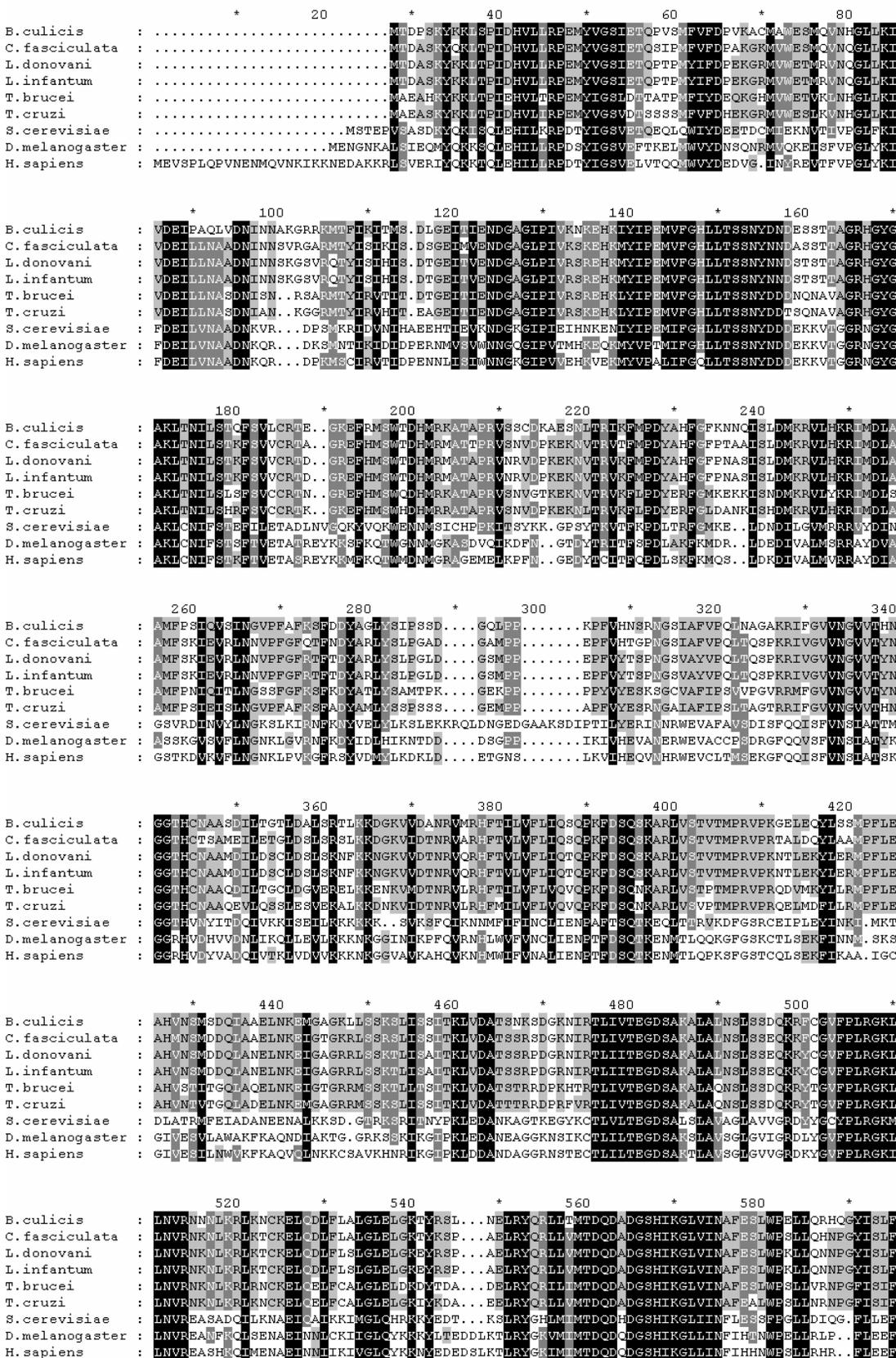
4.5 ANÁLISE COMPARATIVA DA TOPOII DE *B. culicis* COM OUTRAS TOPOII EUCARIÓTICAS

A seqüência de aminoácidos deduzida a partir do gene *BcTOP2* foi alinhada com a seqüência de outras topoisomerases eucarióticas descritas na literatura. O alinhamento mostrou que BcTOPOII possui uma similaridade de cerca de 77% com as TOPOII dos tripanosomatídeos e de 50% com outras topoisomerases eucarióticas (TABELA 6).

TABELA 6 - PORCENTAGEM DE HOMOLOGIA ENTRE TOPOISOMERASES II EUCARIÓTICAS	
	<i>B.culicis</i> (IDENTIDADE/SIMILARIDADE)
<i>C.fasciculata</i>	71% / 81%
<i>L.infantum</i>	68% / 79%
<i>T.brucei</i>	61% / 74%
<i>T.cruzi</i>	64% / 76%
<i>S.cerevisiae</i>	30%/50%
<i>D.melanogaster</i>	35%/51%
<i>H.sapiens</i>	31%/48%

A homologia entre as topoisomerases II esta dispersa por toda seqüência, porem é menor na região próxima ao carboxi-terminal dessas proteínas (FIGURA 11), sendo esta característica comum a todas as topoisomerases do tipo II descritas. O resíduo de tirosina (Tyr775) da TOPOII de *B.culicis*, que pode ser alinhado com a tirosina do sitio ativo da DNA girase, também pode ser alinhado com o resíduo de tirosina do sítio ativo da TOPOII de *S.cerevisiae* (WORLD, WANG, 1989). Este resíduo de tirosina é conservado em todas as TOPOII eucarióticas.

FIGURA 11 - ALINHAMENTO MULTIPLO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE TOPOII



```

600          *          620          *          640          *          660          *          680
B.culicis   : STPIVKKRPRGKNQDVLSPFYSFKDFHRWQRAHPN.VMNTAKYYKGLGTSTTAEKGKEYFADMERNVRLVVE.PHDHRLLDVSDS
C.fasciculata : STPIVKKVNGKAKEVVAAPHSPRDFHRWQRAHPN.ARMSAKYYKGLGTSTTAEKGKEYFADMERNVRLVVE.PHDHRLLDVSDS
L.donovani  : STPIVKKVSGKSKVEVIAAPHSPRDFHRWQRAHES.ARYTAKYYKGLGTSTTAEKGKEYFADMERNVRLVVE.ARDHQLLDVSDA
L.infantum  : STPIVKKVSGKSKVEVIAAPHSPRDFHRWQRAHES.ARYTAKYYKGLGTSTTAEKGKEYFADMERNVRLVVE.ARDHQLLDVSDA
T.brucei    : STPIVKARLRDKS..VVSFFSMKEPHKWRQNSAN.TEPTCKYYKGLGTSTTAEKGKEYFADMERNVRLVVE.RSDHRLLDVSDS
T.cruzi     : STPIVKKVRLRDKS..THSFFSLKESHKQKTHGN.VSMTAKYYKGLGTSTTAEKGKEYFADMERNVRLVVE.RNDHRLLDVSDS
S.cerevisiae : ITPILKYSTTKPKNTLAFYNNPDEKWRREESHKFMMKRYKGLGTSLACEVREYFENLDRHLKLFHSLQGGNDKDYTLIASK
D.melanogaster : ITPVKAATKKN...EELSFPYLPPEEEMKNDTANHNYNNKRYKGLGTSTSKBAKEYFQDMDRHRLLFKYDGSVDDESTVMAPSK
H.sapiens   : ITPVKKSKNK...QEMAFYSLPPEEEMKSSSTPHHKKMKVYKGLGTSTSKBAKEYFADMERNVRLVQPKYSGPDDAAI.SLAKSK

```

```

          *          700          *          720          *          740          *          760
B.culicis   : QEVEWRDRMNTKANAFNG.....DVIDDRSKRVLSTPDPVHKREMVHFAIAGNARALAHSDVGLKPSQRKLLMAMLFKRGKAE
C.fasciculata : AEVEWRREWMSKANAFQG.....EVDLDRSKRLLTIGDFVHKREMVHFAIVGNARALPHCVDLKPSQRKLLMAMLRHSSSE
L.donovani  : AEVEWRREWMTKANAFQG.....EIDLDRSKRLLTTEPFVHKREMVHFAIVGNARALPHCVDLKPSQRKLLMAMLRHNSSE
L.infantum  : AEVEWRREWMTKANAFQG.....EIDLDRSKRLLTTEPFVHKREMVHFAIVGNARALPHCVDLKPSQRKLLMAMLRHNSSE
T.brucei    : QEVEWRDRMNTKANAFNG.....EVDLDRSKRLLTIGDFVHKREMVHFAIVGNARALAHSDVGLKPSQRKLLMAMLRHNSNE
T.cruzi     : QEVEWRDRMNTKANAFNG.....EVDLDRSKRLLTIGDFVHKREMVHFAIAGNARALAHAVDGLKPSQRKLLMAMLRHNSNE
S.cerevisiae : KKADRRREWLRQYEPG.....TVLDDPRLRTEPESDPINRELLIFSLADNIRSTENVLDGFRPQQRKVLVYGCFFKKNLKS
D.melanogaster : KHLESRKRWLNTNHMDEVKRRKELGLPERYLYTGKRSITLYADFINLELVFSNADNERSIE.SLVDGLKPSQRKVMPTCFKRNDRK
H.sapiens   : KQDDRREWLRQYEPG.....TVLDDPRLRTEPESDPINRELLIFSNADNERSIE.SLVDGLKPSQRKVMPTCFKRNDRK

```

```

          *          780          *          800          *          820          *          840          *
B.culicis   : SARVAQLSGYISBVSFHHGEMSLQETIIVKMAQNFTEGNNINLLVPEGGFGSRQOIGNDHAAARVIFPKLSRFARLFFBEDDPL
C.fasciculata : AAKVAQLSGYISBVSFHHGEMSLQETIIVKMAQNFTEGNNINLLVPEGGFGSRQOIGNDHAAARVIFPKLSRFARLFFBEDDPL
L.donovani  : ASKVAQLSGYISBVSFHHGEMSLQETIIVKMAQNFTEGNNINLLVPEGGFGSRQOIGNDHAAARVIFPKLSRFARLFFBEDDPL
L.infantum  : AAKVAQLSGYISBVSFHHGEMSLQETIIVKMAQNFTEGNNINLLVPEGGFGSRQOIGNDHAAARVIFPKLSRFARLFFBEDDPL
T.brucei    : AAKVAQLSGYISBVSFHHGEMSLQETIIVKMAQNFTEGNNINLLVPEGGFGSRQOIGNDHAAARVIFPKLSRFARLFFBEDDPL
T.cruzi     : SARVAQLSGYISBVSFHHGEMSLQETIIVKMAQNFTEGNNINLLVPEGGFGSRQOIGNDHAAARVIFPKLSRFARLFFBEDDPL
S.cerevisiae : ELKVAQDAFVVEBCTAYHHGECSLAQTTIIGLAQNFVGSNNIYLLLENGAFGTRATGGRDAARMIYTELNKLTRKTFHADDDPL
D.melanogaster : EVKVAQLSGVABMSAYHHGEMSLQETIIVKMAQNFVGSNNINLLVPEGGFGTRLSGGRDCAASARVIFPIMSPTIRLTYHEDDDPL
H.sapiens   : EVKVAQLASVABMSAYHHGEMSLMMTIINLAQNFVGSNNINLLVPEGGFGTRLSGGRDCAASARVIFPIMSPTIRLTYHEDDDHT

```

```

          *          860          *          880          *          900          *          920          *
B.culicis   : LDYTEBEGTTEBHHYVPIPLMILLNGAVGIGFGFASNTISPHFLDWSAAVRAMINGESAKQVVRNLVFAVAGVCGVVRGPEGE
C.fasciculata : LDYTEBEGTTEBHHYVPIPLMILLNGAVGIGFGFASNTISPHFLDWSAAVRAMINGESAKQVVRNLVFAVAGVCGVVRGPEGE
L.donovani  : LDYTEBEGTTEBHHYVPIPLMILLNGAVGIGFGFASNTISPHFLDWSAAVRAMINGESAKQVVRNLVFAVAGVCGVVRGPEGE
L.infantum  : LDYTEBEGTTEBHHYVPIPLMILLNGAVGIGFGFASNTISPHFLDWSAAVRAMINGESAKQVVRNLVFAVAGVCGVVRGPEGE
T.brucei    : LDYTEBEGTTEBHHYVPIPLMILLNGAVGIGFGFASNTISPHFLDWSAAVRAMINGESAKQVVRNLVFAVAGVCGVVRGPEGE
T.cruzi     : LDYTEBEGTTEBHHYVPIPLMILLNGAVGIGFGFASNTISPHFLDWSAAVRAMINGESAKQVVRNLVFAVAGVCGVVRGPEGE
S.cerevisiae : YKYTEBEGTTEBHHYVPIPLMILLNGAVGIGFGFASNTISPHFLDWSAAVRAMINGESAKQVVRNLVFAVAGVCGVVRGPEGE
D.melanogaster : LDYTEBEGTTEBHHYVPIPLMILLNGAVGIGFGFASNTISPHFLDWSAAVRAMINGESAKQVVRNLVFAVAGVCGVVRGPEGE
H.sapiens   : LKFLYDDNQVTEBHHYVPIPLMILLNGAVGIGFGFASNTISPHFLDWSAAVRAMINGESAKQVVRNLVFAVAGVCGVVRGPEGE

```

```

          *          940          *          960          *          980          *          1000          *          1020
B.culicis   : FIAVGKYSAKKNYIIVSELEPMTSIEAFRSHISLAN.....MDVVQRTADYSGANHIDIDILV....EGSMTTWSVEADLI
C.fasciculata : YIAVGKYTAHRNGRIIVSELEPMTSIEAFRSHISLAN.....SDVVQRTADYSGANHIDIDILV....EGSMTTWAECETDL
L.donovani  : FIAVGKYTAHPNGRFHISELEPMTSIEAFRSHISLAN.....ADVVQRTADYSGANHIDIDILV....DGLTWTWACETDDL
L.infantum  : FIAVGKYTAHPNGRFHISELEPMTSIEAFRSHISLAN.....ADVVQRTADYSGANHIDIDILV....DGLTWTWACETDDL
T.brucei    : FIAVGTYTYCKGRVHVTELEPNTCSVEAFRSHISLAN.....KDVVQRTADYSGANHVDIDVVA....QGAVNNTYACESEL
T.cruzi     : FIAAGSYQYVYDGRVHVTELEPNTCSVEAFRSHISLAN.....KDVVQRTADYSGANHVDIDVVA....NGAMTYACESEL
S.cerevisiae : YRMVGRLEQIGDNVLEIPELPAWTSTIRIYLLGLS.GNDIKKPMKIDMEEQHDDN.IKFIITLS..PEEMAKTRKIGSFYERF
D.melanogaster : YIQGNLQILSGNRIEISELVGVTWNTNKBENVLEPLSNGTEKVKGLISEYRE.HDITTVRFVTSFAPGEPERIHABEGGFYRVF
H.sapiens   : YVISEVAAILNSTTEISELEPMTSIEAFRSHISLAN.....MDVVQRTADYSGANHIDIDILV....EGSMTTWSVEADLI

```

```

          *          1040          *          1060          *          1080          *          1100
B.culicis   : ALSQKLYIN.GTVFSESGTLAPLEGDLSPILQRFDRLNLYKRRARQGLLEHDLACLESTRKFMVHFQCGIDFMTATDDEL
C.fasciculata : ALSQKLYIN.GTVFSESGTLAPLEGDLSPILQRFDRLNLYKRRARQGLLEHDLACLESTRKFMVHFQCGIDFMTATDDEL
L.donovani  : ALAQRYIN.GTVFSESGTLAPLEGDLSPILQRFDRLNLYKRRARQGLLEHDLACLESTRKFMVHFQCGIDFMTATDDEL
L.infantum  : ALAQRYIN.GTVFSESGTLAPLEGDLSPILQRFDRLNLYKRRARQGLLEHDLACLESTRKFMVHFQCGIDFMTATDDEL
T.brucei    : GLTQRHIN.GTVFSESGTLAPLEGDLSPILQRFDRLNLYKRRARQGLLEHDLACLESTRKFMVHFQCGIDFMTATDDEL
T.cruzi     : SLTQRHIN.GTVFSESGTLAPLEGDLSPILQRFDRLNLYKRRARQGLLEHDLACLESTRKFMVHFQCGIDFMTATDDEL
S.cerevisiae : KLLSPLSLMMVAFDHEKIKKYN.SVNEILSFPYVLEYYQRDRDMSERLQWVEYYSFQVKFLMILEKELTUVNKRPNAI
D.melanogaster : KLLTTLSTMMHAFDQNNLRFP.TAIDILKEYKIKREYARRDPLVGLTAQADRLSDQARFLEKCEKRLVTVNKRQKAM
H.sapiens   : KLLSPLSLMMVAFDHEKIKKYN.TVLDLIDRDFEIRLRYKGLRREWLGMISGASARLNNOARFLEKCEKRLVTVNKRQKAM

```

```

          *          1120          *          1140          *          1160          *          1180          *
B.culicis   : QRVCDRTHLQR.....VDAR.....YDYILKREITDFTTSTN
C.fasciculata : KRTCVKLGIVR.....VDDG.....YDYILKREITDFTTSTN
L.donovani  : KRTCVKLGIVR.....VDES.....YDYILKREITDFTTSTN
L.infantum  : KRTCVKLGIVR.....VDES.....YDYILKREITDFTTSTN
T.brucei    : KRVCCKLGLVR.....VDDG.....YDYILKREITDFTTSTN
T.cruzi     : KRTCVKLGIVR.....VDDG.....YDYILKREITDFTTSTN
S.cerevisiae : IQELENLGFPRFNKGEKPYGSPNDEIAEQNDVKGATSDDEBESSHEDTENVINPPELYG....TYDYILGMIRVSLTNER
D.melanogaster : CDELLRRCYR..PDPVKEMQRRIKMEDAEQALDEDEBEEBAAPSVSSKAKKEKVEDPEKAFKLLTDVKFFDYLLGMSMMMLTEBK
H.sapiens   : IRVLIQRYD..SDPVKAWK....EAQQK...DEEENEESDNEKETEKSDSVTDSGP.....TFNYLLDMELMLTTEK

```

```

      1200      *      1220      *      1240      *      1260      *
B.culicis      : TTRDDDDIKKLCDSIEEMKKTPTTRMMRELDQFDKLEEEYERVLNNSIQ.....K...EMFDKMPGKGLVFR...
C.fasciculata : TERFOADIKKTCDSTAVLNQTPVVRMMTELDKQDKTFQBYERVLNHSIQ.....K...EQRPASITGGEEVPE...
L.donovani     : TERFOADIKKTCACTBELKRTTPVVRMMTELDKQDKTFQBYERVLNHSIQ.....K...EQRSSSITGGVEPE...
L.infantum     : TERFOADIKKTCACTBELKRTTPVVRMMTELDKQDKTFQBYERVLNHSIQ.....K...EQRSSSITGGVEPE...
T.brucei       : FENLKKLAETERRLEALKKTPPVCLMTEGELDQDRFFQDHEKKMVEAIL.....K...ERRQRSPF.SDLLE...
T.cruzi        : LEMNRRKISETEKRDKDKKKTAPVQMMDELDKQDRABEHEHTAVATIL.....K...ERRVNPPT.GDVSR...
S.cerevisiae   : YQRLLKQKQEKTELEENLKKLAKDIMNTDLKAEVGVQEFLLQDAEAR.....GGNVPM.K...GSRTKGKGRKLD...
D.melanogaster : KNEELKQRDTKLSLELSLRRKTPPEMLMDDLLALESKLNVEEKEAAE.....QGINLRTAKALKGRSASAKGRKVK...
H.sapiens      : KDELCRLRNEKQELDTLKKRSPSDDMKEDLATAIEELEAVEAKEKQDEQVGLPGKGGKAKGRKQMAEVLVPSPRGQRVPRITII

      1280      *      1300      *      1320      *      1340      *      1360
B.culicis      : .....SLOAPELELEV.LK.....GVKERFMRITQAYQHVPVPPPSKRKKEQDGMEGG.....
C.fasciculata : .....ALRCPPIMLDAPAK.....GAASSYRVHICRYEPEEASKRKKEEDTYGGALSS.....
L.donovani     : .....ALRCPDMLDASAK.....DAT..AYRVHACQYKPEPPPSKRREGEVSGGARPS.....
L.infantum     : .....ALRCPDMLDASAK.....GAT..AYRVHACQYKPEPPPSKRREGEVSGGARPS.....
T.brucei       : .....GLQCPREVEVEAK.....GGKKFEMRVQVRKYVPPPE.TRRGAGGRSDGDDG.....
T.cruzi        : .....NLQCPREVEVEKV.....SSSGKSVEMRVVRVKYVPPPEPKRPHVGGVSGVGGGG.....
S.cerevisiae   : DEDYDESKN...KKSTARKGKKIKEDKNFER.LLLEQKLVTKSKAPT...KKEKTPSVSETHTEEEENABSSSTSSSIFDIK
D.melanogaster : .MGGGAGAGD...VFPDPDGEVPEFRTELEIKK.MAAAAKVAQAAKEPK...KPEKPEKPKVKEE...KQKQKAEPSAGDEVDFD
H.sapiens      : EMKAEAEKKNKKIKNENTEGSPQDGVLELGLKQRLKQKREPGETTKKQTTLAFKPIKGRKRNPEWSDSESDRSSDNFV

      *      1380      *      1400      *      1420      *      1440
B.culicis      : ....GGAARTVGRIRNVKGLKGR.....KT.....RRRATRMVDFVGNLQR.....VLEVPFRFL
C.fasciculata : ....GGSTRNVGRITGARGAKKK..VVRRTRT.....KMSLGTVAEFPAGAQLGR.....LLEQDPRLL
L.donovani     : ....DSAARTVGRILVGSRSVFNKPKMSRKNV.....KVSLSRVAQFAGAQLGR.....LLEPHVLM..
L.infantum     : ....DSAARTVGRILVGSRSVFNKPKMSRKNV.....KVSLSRVAQFAGAQLGR.....LLEPHVLM..
T.brucei       : ....ATAAGAAAAGGRGKKG...GR.....AGGVRRMVLDAKRVTR.....LLEPRDLF..
T.cruzi        : ....GGSVRSAAAVVAHVKAEKKA.....AR.....ARSMQMLLDVVARQV...VLEPTEWFL
S.cerevisiae   : KEDKDEGELSKI...PKKISTIFDKMGSTSATSKE.....NTPEQDDVATKKNQTTAK...TAKKPKLAKKP
D.melanogaster : AMVEGGSKTSPKAKAVVVKKEPEKPKPKKENG...GLKQSKIDFSKAKAKKSD...DDVEE...TPRAERP
H.sapiens      : EPRETEPRRAATKTFMTDLDSEDFSDFDEKTDDEDFVPSDASPPKTKTSPKLSNKLKPKQKSVSDLEADDVKGSVLELSSPP

      *      1460      *      1480      *      1500      *      1520      *
B.culicis      : F.....
C.fasciculata : F.....
L.donovani     : .....
L.infantum     : .....
T.brucei       : .....
T.cruzi        : F.....
S.cerevisiae   : VRQKQKVVELS....GESDLEILDSTYDREDSNKDEDDAIPQRSRRQR...SSRAASVPKKS...VETLELSDSFIEDDE
D.melanogaster : BRQASKKIDYSSLSDEEEDGGNVGSDDDGNASDDDSFKRPAKRGREDE...SSGAKKKAEPK...KRAVIESDDDDIEID.
H.sapiens      : ATHFPDETEITNPEVKKNVTVKKTAAKQSSTSTTGAKKRAAPKGTKRDPALNSGVSQKPDPAKTKNRRKRKSTSDSDSNFKE

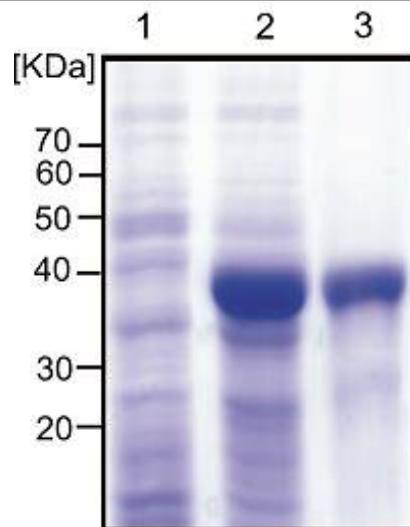
      1540      *      1560      *      1580
B.culicis      : .....
C.fasciculata : .....
L.donovani     : .....
L.infantum     : .....
T.brucei       : .....
T.cruzi        : .....
S.cerevisiae   : .....E...ENQGSVVSFNEED.....
D.melanogaster : .....EDDDDDSFNC.....
H.sapiens      : IVSKAVTSKSKGESDDFHMDFDSAVAPRAKSVRAKPKIKYLEESDEDDLF.

```

NOTA: Comparação das seqüências de aminoácidos deduzidas a partir dos genes *TOP2* de *B. culicis*, *C. fasciculata*, *L. donovani*, *L. infantum*, *T.brucei*, *T.cruzi*, *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *H. sapiens*. As regiões coloridas de preto representam seqüências com 100% de identidade. As regiões coloridas de cinza escuro ou cinza claro representam seqüências com menor homologia. A coluna em vermelho representa o provável resíduo de tirosina envolvido na ligação covalente entre a TOPOII e o DNA.

4.6 EXPRESSÃO DE UM FRAGMENTO DO GENE *BcTOP2* E PRODUÇÃO DE ANTI-SORO CONTRA A TOPOISOMERASE II DE *B. culicis*

Com o propósito de produzir um antisoro policlonal contra a topo II de *B. culicis*, a região 3' do gene *BcTOP2* (nucleotídeos 3394-3693) que codifica um fragmento de 11,3 kDa a partir do carboxi-terminal da BctopII foi clonada em fase com a extremidade 3' do gene da GFP no vetor pQE8 para expressão em *E.coli*. Escolhemos esta região do gene *BcTOP2* por ser aquela que codifica a região menos conservada entre as topoisomerasas do tipo II, evitando assim, uma possível reação cruzada com uma topoII distinta ou com proteínas que contenham o domínio de ATPase similar ao das outras topoII. A fusão do carboxi-terminal de BcTOPOII com GFP foi feita com o intuito de aumentar a estabilidade e a solubilidade da proteína em *E.coli*. Artigos relatam que a expressão de proteínas fusionadas ao carboxi-terminal de GFP se tornam mais solúveis e estáveis em *E. coli* (RUCKER et al., 2001). Um dos clones selecionados, denominado de pQEGFPCTOP foi utilizado para expressar o fragmento do gene *BcTOP2* na cepa M15 de *E. coli*. Extratos do clone pQEGFPCTOP induzidos ou não com IPTG foram analisados em SDS-PAGE. Pode-se visualizar no extrato bacteriano induzido o aparecimento de uma banda de massa molecular de aproximadamente 38,7 kDa, que é compatível com o tamanho esperado e que não está presente no extrato não induzido (FIGURA 12). A proteína recombinante foi purificada em coluna de níquel-NTA. A purificação foi bastante satisfatória para permitir a produção de antisoro em coelhos.

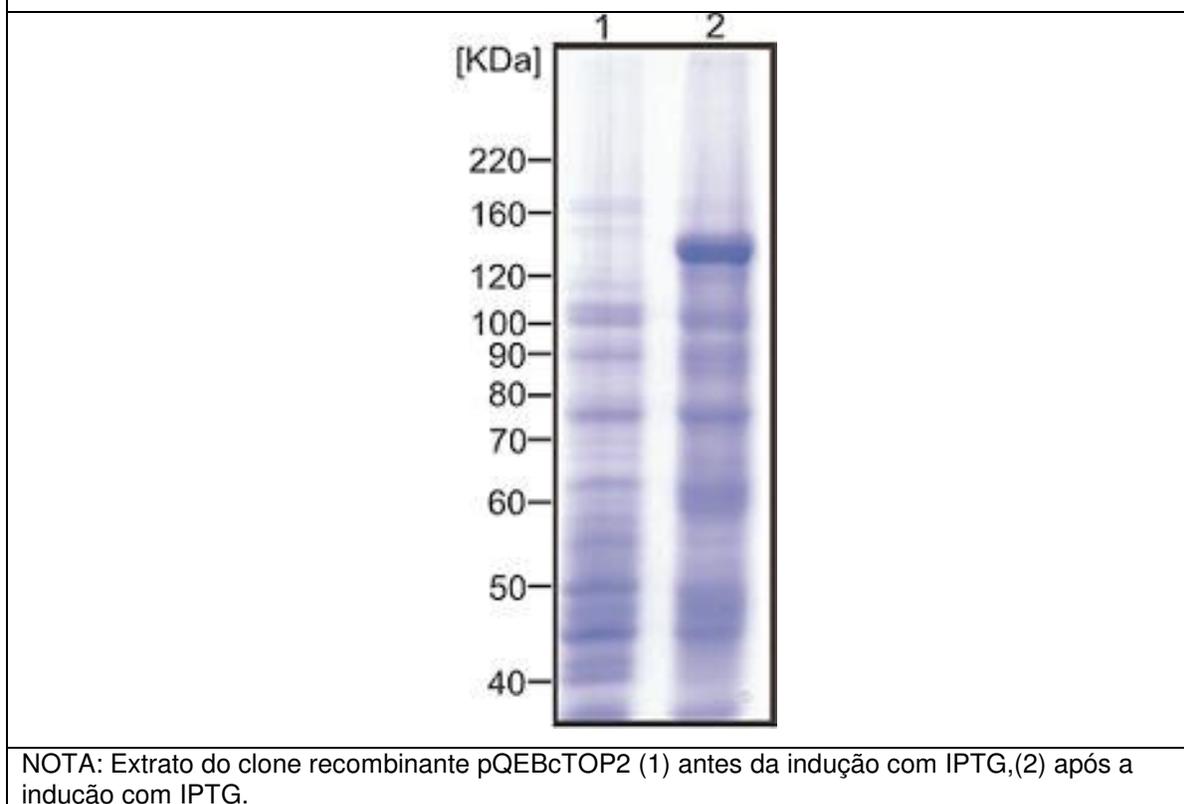
FIGURA 12- EXPRESSÃO DE UM FRAGMENTO DO GENE *BcTOP2*

NOTA: Extrato do clone recombinante pQEGFPCTOP (1) antes da indução com IPTG, (2) após a indução com IPTG, (3) Proteína de fusão GFPCTOP purificada em coluna de níquel.

4.7 EXPRESSÃO DO GENE *BcTOP2* EM *E.coli*

O gene *BcTOP2* foi clonado em mesma fase de leitura com a seqüência que codifica a etiqueta de seis resíduos de histidina no vetor pQE30. Um dos clones selecionados, denominado pQEBcTOP2 foi utilizado para expressar o gene *BcTOP2* na cepa M15 de *E. coli*. Extratos do clone pQEBcTOP2, induzidos ou não com IPTG, foram analisados em SDS-PAGE. Pode-se visualizar no extrato bacteriano induzido o aparecimento de uma banda de peso molecular de aproximadamente 138 kDa, que corresponde ao peso molecular esperado e que não está presente no extrato não induzido (FIGURA 13). Embora a expressão de *BcTOP2* em *E.coli* tenha sido bastante satisfatória, infelizmente a proteína é majoritariamente insolúvel, o que impossibilita sua purificação para testes de atividade.

FIGURA 13 - EXPRESSÃO DO GENE *BcTOP2* EM *E.coli*



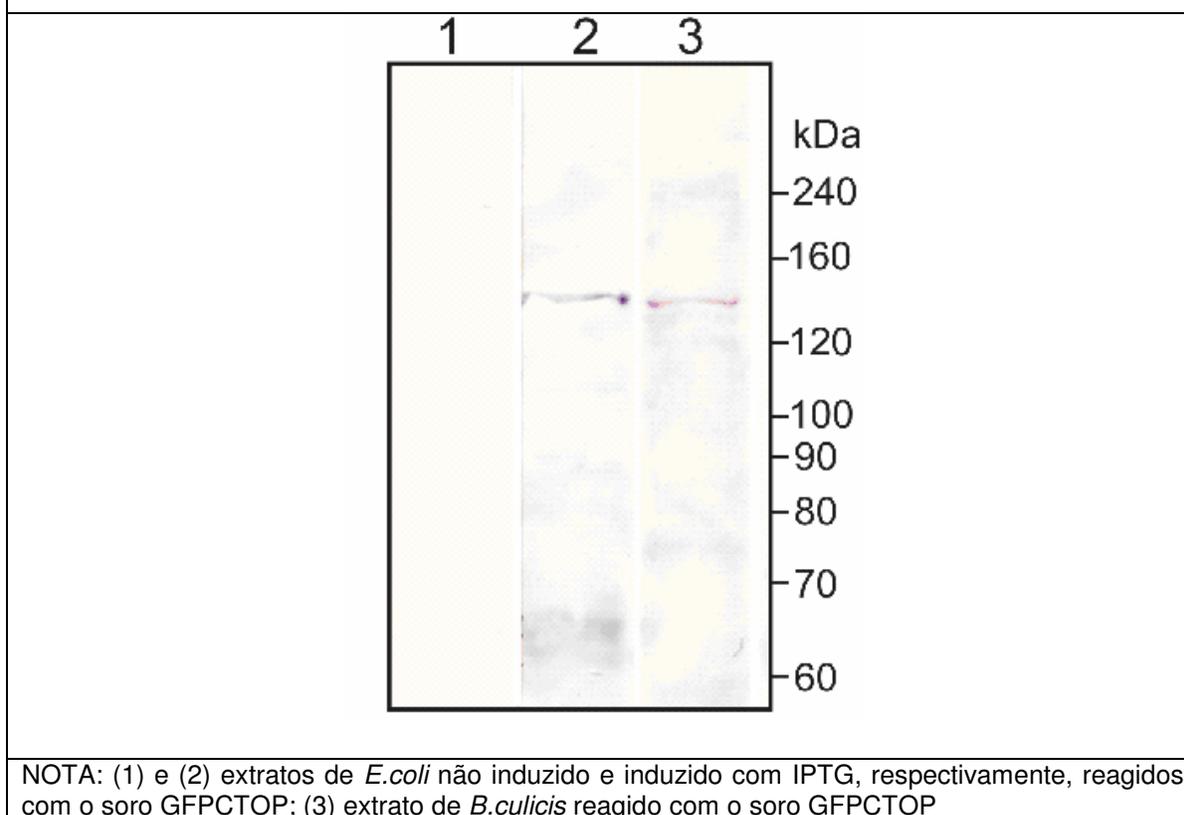
NOTA: Extrato do clone recombinante pQEBcTOP2 (1) antes da indução com IPTG,(2) após a indução com IPTG.

4.8 ANALISE DA EXPRESSÃO DE TOPOII POR WESTERN BLOT

O antisoro contra topo II de *B. culicis* (GFPCTOP) foi utilizado em ensaio de *western blot*, com o objetivo de detectar a expressão da enzima e avaliar sua massa molecular, em extratos celulares de *B. culicis* bem como em extratos de *E. coli* expressando ou não BcTOPOII recombinante. O resultado desta análise mostrou que o antisoro GFPCTOP reconheceu tanto em extratos celulares de *B. culicis* quanto na *E. coli* recombinante, um polipeptídeo com massa molecular de 138 kDa (FIGURA 14).

O antisoro GFPCTOP também foi utilizado em extratos de *T. cruzi* e *C. fasciculata* com o objetivo de avaliar se o soro era específico para topo II de *B. culicis*. Como esperado, o antisoro GFPCTOP não reagiu com nenhum polipeptídeo de *T. cruzi* ou *C. fasciculata*.

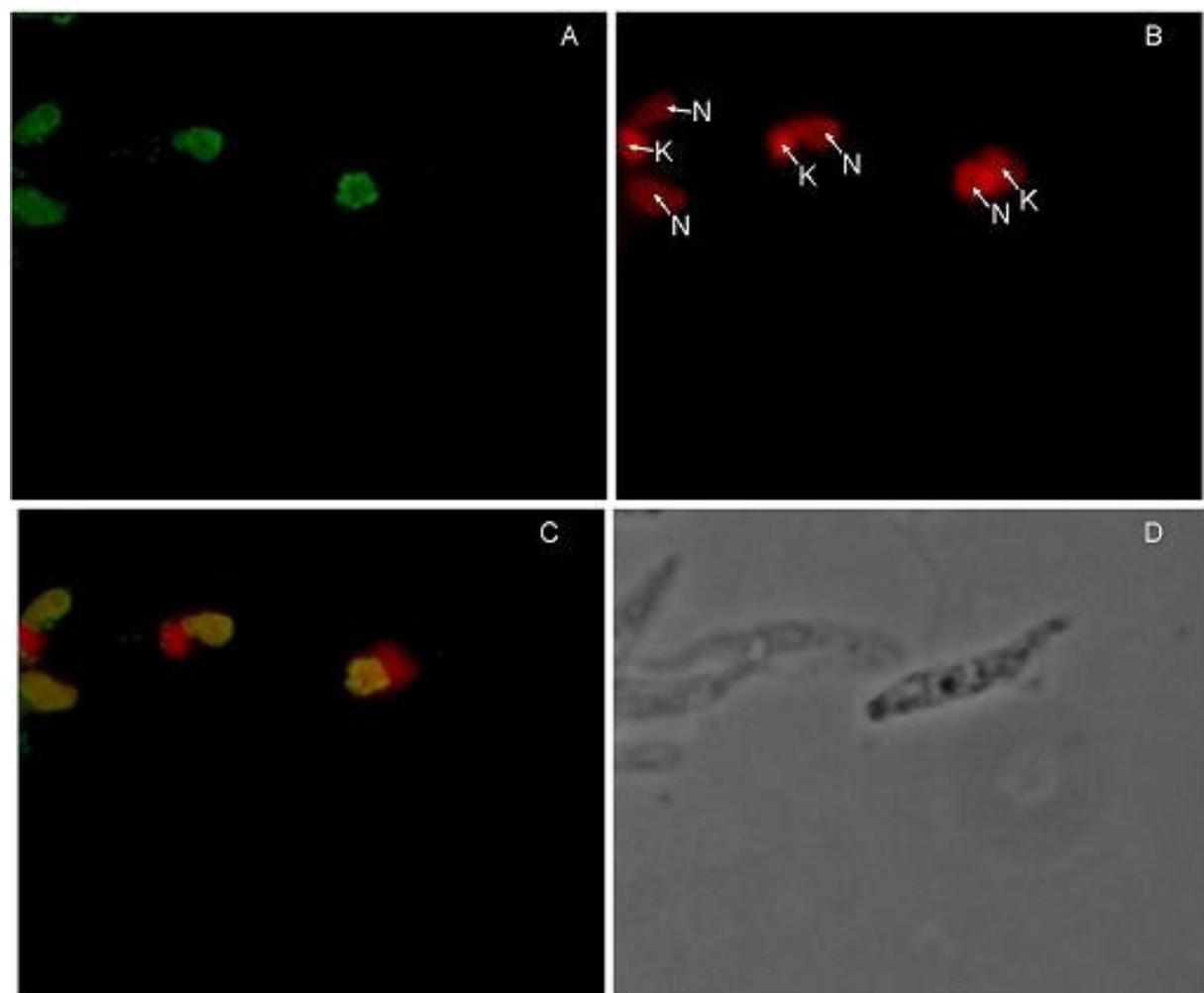
FIGURA 14 - ANALISE DA EXPRESSÃO DE TOPOII POR WESTERN BLOT



4.9 LOCALIZAÇÃO CELULAR

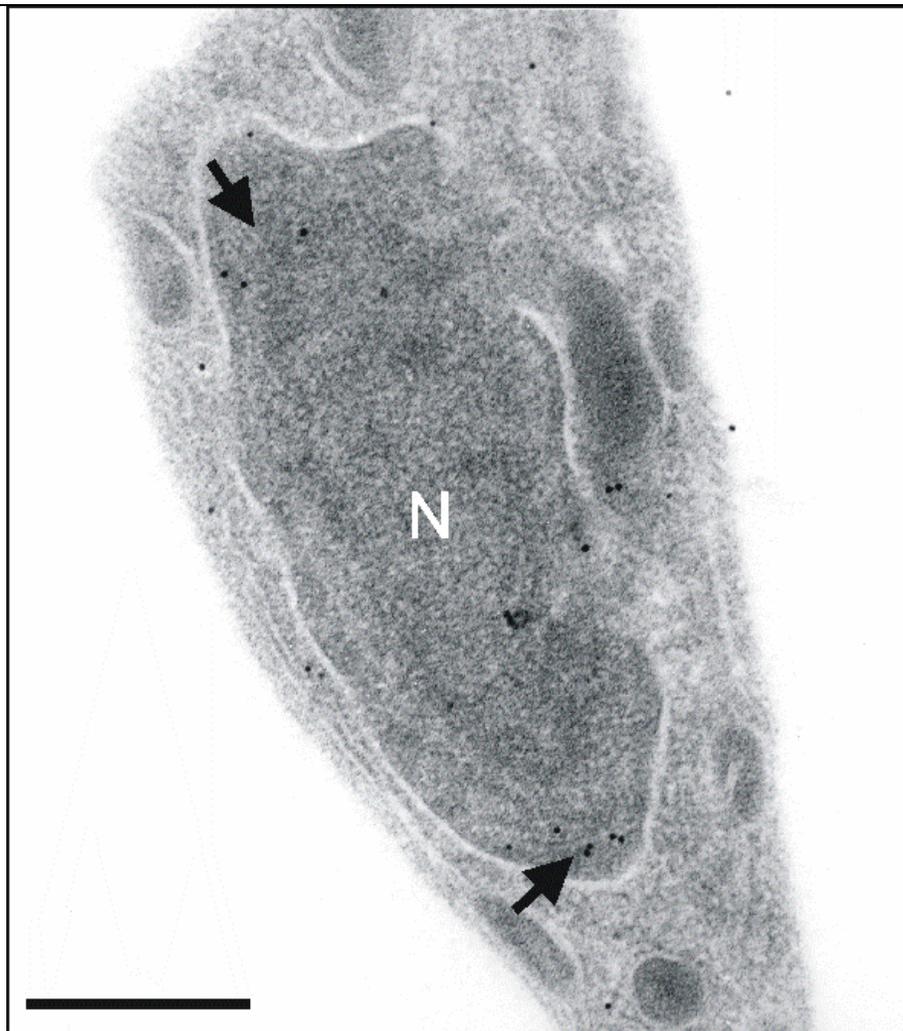
O antisoro GFPCTOP foi utilizado para investigar a localização celular da topoll de *B.culicis* por ensaios de imunofluorescência indireta e imunocitoquímica utilizando microscopia eletrônica de transmissão. O soro GFPCTOP reconheceu um antígeno exclusivamente nuclear. Podemos notar que a marcação é mais intensa na periferia nuclear (FIGURA 15), como confirmado por imunocitoquímica ultraestrutural usando microscopia eletrônica de transmissão (FIGURA 16).

FIGURA 15 - IMUNOLocalização de BcTOPOII POR MICROSCOPIA ÓPTICA



(A) imagem de fluorescência, mostrando a marcação no núcleo. (B) Núcleo (N) e cinetoplasto (K) marcados com iodeto de propídio (C) sobreposição das imagens (B) e (C). (D) imagem de contraste de fase das células mostradas em (A).

FIGURA 16 - LOCALIZAÇÃO CELULAR DE B α TOPOII POR IMUNOCITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL.



NOTA: As partículas de ouro estão distribuídas ao longo no envelope nuclear (setas). N= núcleo

5 DISCUSSÃO

As DNA topoisomerase desempenham papéis fundamentais na manipulação da topologia da molécula de DNA nos processos de replicação, transcrição, recombinação e segregação dos cromossomos (CHAMPOUX, 2001). Nos protozoários da ordem Kinetoplastida as topoisomerases além de desempenharem seu papel no metabolismo do DNA nuclear elas também são fundamentais no processo de replicação e na organização do kDNA. (SHAPIRO, ENGLUND, 1995; WANG, ENGLUND, 2001). Tais enzimas liberam os minicírculos da rede de kDNA para que estes sofram replicação como minicírculos livres, participam na segregação dos minicírculos recém sintetizados e religam os mesmos a periferia da rede. As topoisomerases também participam no ancoramento da rede a membrana mitocondrial e na segregação da rede de kDNA após a replicação (SHAPIRO, ENGLUND 1995). Diversos trabalhos demonstram que a topoisomerase é uma enzima chave no processo de replicação do kDNA. Estudos utilizando inibidores da TOPOII tanto procariótica (DNA girase) quanto eucariótica são capazes de bloquear a proliferação celular em tripanosomatídeos causando danos estruturais principalmente a nível de cinetoplasto (GONZALES-PERDOMO et al 1990; SHAPIRO, SHOWALTER, 1994; CAVALCANTI et al., 2004). TOPOII já foi purificada de diversos kinetoplastídeos, tais como *T. cruzi* (DOUC-RASY et al., 1986), *L. donovani* (CHAKRABORTY, MAJUMDER, 1987) e *C. fasciculata* (MELENDY, RAY, 1989). O gene *TOP2* já foi clonado e caracterizado em *T. brucei* (STRAUSS; WANG, 1990), *T. cruzi* (FRAGOSO; GOLDENBERG, 1992), *C. fasciculata* (PACION et al., 1992), *L. donovani* (DAS et al., 2001), *L. infantum* (HANKE et al., 2003) e *Bodo saltans* (GAZIOVÁ, LUKES, 2003). Neste trabalho nos clonamos e caracterizamos o que codifica a enzima TOPOII no tripanosomatídeo monoxênico *B.culicis*.

Nossas análises mostraram que o gene *BcTOP2* apresenta um quadro aberto de leitura com 3.693 pb que codifica um polipeptídeo com 1.231 resíduos de aminoácidos (138 kDa). O gene *BcTOP2* transcreve um RNA de 4,5 kb, com tamanho compatível com aquele da fase de leitura encontrada, sugerindo que os

codons de iniciação e terminação estão definidos corretamente. De maneira similar a outros tripanosomatídeos, o gene *BcTOP2* é um gene de cópia única. A seqüência de aminoácidos deduzida a partir de *BcTOP2* foi analisada para a busca de sinais de endereçamento celular (núcleo e/ou mitocôndria). Inicialmente procuramos o sinal necessário para dirigir a proteína para a mitocôndria. Esse sinal é dado por uma pequena seqüência de aminoácidos, geralmente na região amino-terminal ou próximo desta, conhecida como pré-seqüência. A pré-seqüência para mitocôndria se caracteriza por: (1) serem regiões ricas em aminoácidos básicos e hidroxilados, (2) ausência de aminoácidos ácidos (3) serem regiões anfífilas (VERNER, SCHATZ, 1988; WIEDEMANN, FRAZIER, PFANNER, 2004). Essas pré-seqüências são normalmente removidas por uma metalo-protease após entrar na mitocôndria (EILERS et al.,1988). A análise da região amino-terminal da topo II deduzida do gene *BcTOP2* não evidenciou tais características.

Assim como as proteínas mitocôndrias, o transporte de proteínas nucleares é mediado por seqüências sinais, conhecidas como sinais de localização celular ou NLSs (do inglês Nuclear Localization Signals). Muitas NLSs já foram identificadas, mas nenhum consenso emergiu entre elas, sugerindo que a forma e a carga dos aminoácidos e não sua seqüência primária são importantes para o reconhecimento do sinal (DINGWALL, LAKEY, 1991; GARCIA-BUSTOS et al., 1991). Contudo, as NLSs possuem algumas características : (1) curtas seqüências de aminoácidos básicos [lisina (K) ou arginina (R)], (2) expostos na superfície da proteína a fim de serem reconhecidos por receptor(es), (3) não removidos após a translocação da proteína e (4) simples ou múltiplas NLSs em uma dada proteína , não localizados necessariamente em uma das extremidades da proteína .

As NLSs podem ser divididas em duas classes: (1) NLSs do tipo encontrado no antígeno-T do vírus SV-40 constituídas por apenas uma pequena seqüência de aminoácidos básicos (PKKKRKV) e (2) NLS bipartida constituída de dois domínios básicos independentes. O primeiro domínio (lado N-terminal da seqüência) é composto de pelo menos dois resíduos básicos, seguidos de uma

região espaçadora de tamanho e composição variáveis, que por sua vez é seguida pelo segundo domínio básico que contém pelo menos cinco resíduos dos quais três são básicos (ROBINS et al., 1991). Esse tipo de sinal é encontrado em um grande número de proteínas nucleares, entre elas a nucleoplasmina, fatores de transcrição, polimerases, receptores para hormônios esteróides e topoisomerasas (DINGWALL, LASKEY, 1991)

Nos detectamos na topo II de *B.culicis* a seqüência bipartida (1165-1174 PPPSKRKPKQ) (1188-1205 KRLRNVKGKLGKTRR)). Estudos com a TOPOII de *L. donovani* mostram que NLSs similares ao encontrado em *B. culicis*, localizados no carboxi-terminal da enzima são necessários para o transporte da enzima para o núcleo de *S. cerevisiae* (SENGUPTA et al., 2003). A presença de NLS no carboxi-terminal da topo II de *B. culicis* está de acordo com estudos feitos com TOPOII de *H.sapiens*, *D.melanogaster* e *S.cerevisiae* (JENSON, et al., 1996; CRENSHAW, HSIEH, 1993; CARON, WATT, WANG, 1994). O carboxi-terminal de BcTOPOII contém sítios de fosforilação para caseína quinase II (1072) TKLD e (1084) SIEE, para proteína quinase dependente de cAMP (1089) KKTT e (1204) RRAT e para proteína quinase C (1202) TRR. A fosforilação de regiões que flanqueiam a seqüência sinal é um dos meios para modular a velocidade de entrada da proteína no núcleo aumentando a velocidade do transporte.

Importantes domínios funcionais encontrados em todas TOPOII estão presentes na topoII de *B. culicis*. A seqüência de aminoácidos deduzida de *BcTOP2* apresentou homologia significativa com as subunidades da DNA girase de *E. coli* (HIGGINS et al., 1978). De fato, a região compreendendo os resíduos de aminoácidos 59 a 410 da TOPOII de *B.culicis* é homologa a subunidade B da DNA girase, responsável pela atividade ATPásica dessa enzima, enquanto que a homologia com a subunidade A da DNA girase, subunidade responsável pelas reações de quebra e religação das fitas do DNA, é restrita a porção central da TOPOII de *B.culicis*. Dentro desta porção é possível alinharmos o resíduo de tirosina responsável pela ligação covalente da girase (HOROWITZ, WANG, 1987) com o resíduo de tirosina (Y⁷⁷⁵) na TOPOII de *B.culicis*, sugerindo que na TOPOII de *B.culicis* esse resíduo de tirosina possa ter a mesma função.

A homologia com as subunidades de *E. coli* é consistente com a observação de que inibidores da topo II bacteriana tais como a novobiocina e o ácido nalidixico e seus derivados podem inibir a atividade de topoisomerases do tipo II de tripanosomatídeos. Este dado reforça a suposição de que a inibição de uma topoisomerase do tipo II por essas drogas é, pelo menos em certa extensão, responsável pelo bloqueio da proliferação celular e modificações ultra-estruturais no cinetoplasto dos tripanosomatídeos (GONZALEZ-PERDOMO et al., 1990; CAVALCANTI et al., 2004)

Quando comparamos a seqüência peptídica da TOPOII de *B. culicis* com outras TOPOII eucarióticas observamos uma grande similaridade entre elas (48-81%) sendo que esta homologia está distribuída ao longo da enzima. Analisando o alinhamento observamos uma homologia muito alta nos $\frac{3}{4}$ da seqüência a partir do amino-terminal, porém essa homologia diminui no $\frac{1}{4}$ restante da seqüência que corresponde ao domínio carboxi-terminal da proteína. O resíduo de tirosina (Y⁷⁷⁵) da TOPOII de *B. culicis*, que pode ser alinhado com o resíduo de tirosina do sitio ativo da DNA girase, também pode ser alinhado com o resíduo de tirosina do sitio ativo de *S. cerevisiae* (WORLAND, WANG, 1989). Além disso, este resíduo de tirosina é conservado em todas topoisomerases eucarióticas. Apesar da topoisomerase II de *B. culicis*, assim como a topo II dos outros tripanosomatídeos, apresentar uma alta homologia com as TOPOII eucarióticas, ela possui diferenças suficientes para o desenvolvimento de drogas específicas contra ela.

Com o intuito de analisar a expressão e definir a localização celular da topoisomerase II de *B. culicis*, produzimos um antisoro policlonal GFPCTOP contra a porção carboxi-terminal da enzima. Inicialmente utilizamos o antisoro GFPCTOP para reagir com extratos protéicos de *B. culicis* em ensaio do tipo *western blot*. A análise mostrou que o soro reconhece um único polipeptídeo de aproximadamente 138 kDa, que é compatível com a seqüência de aminoácidos deduzida do gene *BcTOP2*. A massa molecular de BcTOPOII é similar a encontrada para as topo II de *T. cruzi*, *T. brucei* e *C. fasciculata*. Em seguida testamos se o antisoro GFPCTOP era capaz de reconhecer a TOPOII em extratos de *T. cruzi* e *C. fasciculata*. Entretanto, o antisoro GFPCTOP não reagiu com

nenhum polipeptídeo de *T. cruzi* ou *C. fasciculata*, indicando que este é específico para topo II de *B. culicis*, este resultado deve estar relacionado ao fato do antisoro ter sido produzido a partir de um fragmento da porção carboxi-terminal da proteína, que é a região menos conservada nas topoisomerasas do tipo II eucarióticas.

Atualmente há uma considerável controvérsia sobre identidade da TOPOII presente no núcleo, em relação aquela presente na mitocôndria dos kinetoplastídeos, ou seja, não se sabe se essas enzimas são idênticas ou se há formas distintas da enzima nessas duas organelas. A análise por imunofluorescência indireta mostrou que, em *C. fasciculata* e *L. infantum*, a TOPOII está localizada em dois sítios opostos no disco do kDNA (MELENDY et al., 1988; HANKE, et al., 2003). Já em *T. cruzi* a imunolocalização da TOPOII é exclusivamente nuclear (FRAGOSO et al., 1998), enquanto que em *L. donovani* e *B. saltans* a enzima está presente no núcleo e no cinetoplasto. (DAS et al., 2001; GAZIOVÁ, LUKES, 2003).

Com o intuito de definir a localização celular da topoisomerase II de *B. culicis*, utilizamos o antisoro GFPCTOP em ensaios de imunofluorescência indireta e imunocitoquímica utilizando microscopia eletrônica de transmissão. Essa análise mostrou que a TOPOII de *B. culicis* codificada pelo gene *BcTOP2* está localizada exclusivamente no núcleo. A marcação é dispersa em todo o núcleo com pontos mais fortes na periferia nuclear. Este padrão coincide com sítios de replicação descritos em *T. cruzi* sugerindo uma participação da TOPOII neste processo (ELIAS et al., 2002).

Os resultados de imunolocalização com GFPCTOP são interessantes porque, nos ensaios de imunofluorescência com *B. culicis*, usando anticorpos monoclonais produzidos contra a TOPOII mitocondrial de *C. fasciculata*, apenas o cinetoplasto foi marcado (CAVALCANTI et al., 2004), mesmo sabendo que a TOPOII de *B. culicis* e a de *C. fasciculata* compartilham uma similaridade de 81%. É possível que fatores como a concentração da enzima e/ou associações macromoleculares com componentes nucleares estejam mascarando epítopos da TOPOII no cinetoplasto de *B. culicis*. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que em

L. donovani a TOPOII foi imunolocalizada no núcleo e no cinetoplasto do parasita, sendo que o soro utilizado foi produzido com a mesma região utilizada para produzir o soro anti-TcTOPOII, que reconhece uma TOPOII nuclear em *T. cruzi*. Mesmo frente a estes resultados não podemos excluir a possibilidade da existência de uma TOPOII no cinetoplasto diferente da presente no núcleo.

Independente da existência nos tripanosomatídeos de uma ou de múltiplas formas de TOPOII, será interessante estudar o papel de *BcTOP2* em *B. culicis* através da sua inativação por recombinação homologa. Teremos ainda a vantagem de uma obtenção mais rápida de mutantes *TOP2*, uma vez que o tempo de geração de *B. culicis* é menor que dos tripanosomatídeos patogênicos.

Uma vez que a TOPOII de *B. culicis* expressa em *E. coli* foi insolúvel, tentaremos expressar apenas os domínios funcionais da enzima. É importante ressaltar que até o presente momento não existem, nos bancos de dados, estruturas cristalográficas obtidas a partir de topoisomerases do tipo II completas. Paralelo a isto poderemos testar outros sistemas de expressão heteróloga para obter BcTOPOII funcional. Um dos sistemas de expressão que já estamos testando com *BcTOP2* é a expressão em *S. cerevisiae*. Neste sistema além da purificação da enzima recombinante poderemos testar a capacidade de *BcTOP2* em complementar funcionalmente mutantes *top2* condicionais de *S. cerevisiae*.

O estudo de topoisomerases em tripanosomatídeos monoxênicos, como em *B. culicis* além de contribuir para o entendimento da fisiologia dos tripanosomatídeos, também traz a perspectiva de um modelo para as topoisomerases dos tripanosomatídeos em geral. Futuramente, a cristalização da enzima poderá identificar sítios importantes para a atividade enzimática e que servirão de ponto de partida para o desenho racional de novas drogas contra tripanosomatídeos patogênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; THOMAS L. M.; ALEJANDRO A. S.; JINGHUI ZHANG, Z.; WEBB, M.; DAVID J. L. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* v.25, p.3389-3402.

Adachi N, Miyaike M, Kato S, Kanamaru R, Koyama H, Kikuchi A. 1997. *Nucleic Acids Res.* 25:3135–42

Bakshi R.P.; Shapiro T.A.(2003). DNA topoisomerases as targets for antiprotozoal therapy. *Mini Rev Med Chem.* 2003 Sep;3(6):597-608.

Bergerat A, de Massy B, Gadelle D, Varoutas PC, Nicolas A, Forterre P.(1997). An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature.* 27;386(6623):414-7.

Bennett, R.J. and Wang, J.C. (2001) Association of yeast DNA topoisomerase III and Sgs1 DNA helicase: studies of fusion proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98, 11108–11113

Bjergbaek L, Kingma P, Nielsen IS, Wang Y, Westergaard O. 2000. *J. Biol. Chem.* 275:13041–48

Brill, S.J., DiNardo, S., Voelkel-Meiman, K. and Sternglanz, R. (1987). Need for DNA topoisomerase activity as a swivel for DNA replication for transcription of ribosomal RNA. *Nature*, 326, 414-416.

Brown, P. O. & Cozzarelli, N. R. (1981) A sign inversion mechanism for enzymatic supercoiling of DNA *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 843-847

Brown, P. O.; Cozzarelli, N. R. (1981). Catenation and knotting of duplex DNA by type 1 topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **78**, 843–847

BRUESKE, W.A. **The diplosome of *Blastocrithidia culicis* (Novey, Mc Neal and Torrey, 1907) (Mastigophora: Trypanosomatidae).** Minneapolis, 1967. 401f. Ph.D. Dissertation, University of Minnesota.

De SOUZA, W. (1984). Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Rev. Cytol.* 86: 197-283.

Caron, P.R., Watt, P. and Wang, J.C. (1994) The C-terminal domain of *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase II. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 3197–3207.

CAMARGO EP.(1964). GROWTH AND DIFFERENTIATION IN TRYPANOSOMA CRUZI. I. ORIGIN OF METACYCLIC TRYPANOSOMES IN LIQUID MEDIA. Rev Inst Med Trop Sao Paulo.12:93-100.

Chakraborty AK, Majumder HK. (1987). Decatenation of kinetoplast DNA by an ATP-dependent DNA topoisomerase from the kinetoplast hemoflagellate *Leishmania donovani*. Mol Biochem Parasitol.26(3):215-24.

Champoux, J., J.,(2001).DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. Annu Rev Biochem.70:369-413

Cavalcanti DP, Fragoso SP, Goldenberg S, de Souza W, Motta MC. (2004). The effect of topoisomerase II inhibitors on the kinetoplast ultrastructure. Parasitol Res.94(6):439-48.

Collins,I., Weber,A. and Levens,D. (2001) Transcriptional consequences of topoisomerase inhibition. Mol. Cell. Biol., 21, 8437±8451.

Cook PR. (1999) The organization of replication and transcription. Science. 1999 Jun 11;284(5421):1790-5.

Cook PR. (1999). The organization of replication and transcription. Science. 1999 Jun 11;284(5421):1790-5.

COZZARELLI, N. R. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. **Science**. v.207, p.953-960. 1980.

Crenshaw,D.G. and Hsieh,T.S. (1993) Function of the hydrophilic carboxyl terminus of type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster*. I. *In vitro* studies. *J. Biol. Chem.*, **268**, 21335–21343

Das A, Dasgupta A, Sharma S, Ghosh M, Sengupta T, Bandopadhyay S, Majumder HK. (2001). Characterisation of the gene encoding type II DNA topoisomerase from *Leishmania donovani*: a key molecular target in antileishmanial therapy. Nucleic Acids Res.1;29(9):1844-51.

D'ARPA, P.; BEARDMORE, C.; ZHANG, H. & LIU, L. F. Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons. **Cancer Res**. v.50, p.6919-6924. 1990.

De Souza W, Motta MC.(1999).Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family.FEMS Microbiol Lett. 1;173(1):1-8.

- DiNardo S, Voelkel KA, Sternglanz R, Reynolds AE, Wright A. (1982). Escherichia coli DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell*. Nov;31(1):43-51.
- DINGWALL, C.; LASKEY, R., 1991. Nuclear targeting sequences – a consensus. *Trends Biochem. Sci.* 16, 478-481
- Douc-Rasy S, Kayser A, Riou JF, Riou G. (1986). ATP-independent type II topoisomerase from trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;83(19):7152-6.
- Dutta R, Inouye M. GHKL, (2000). An emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem Sci.* Jan;25(1):24-8
- Elias MC, Faria M, Mortara RA, Motta MC, de Souza W, Thiry M, Schenkman S. (2002). Chromosome Localization Changes in the Trypanosoma cruzi Nucleus. *Eukaryot Cell.* Dec; 1(6): 944-953.
- Eilers M, Verner K, Hwang S, Schatz G. (1988). Import of proteins into mitochondria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 31;319(1193):121-6.
- ENDICOTT, J. A. & LING, V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Ann. Rev. Biochem.* v.58, p. 351-375. 1989.
- Englund PT, Marini JC. (1980). The replication of kinetoplast DNA. *Am J Trop Med Hyg.* 29(5 Suppl):1064-9.
- FRAGOSO, S. P.; GOLDENBERG, S. (1992). Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* DNA topoisomerase II. **Molec. Biochem. Parasitol.** v.55, p.127-134
- FRAGOSO, S.P.; MATTEI, D.; HINES J.C.; RAY, D.; GOLDENBERG, S. (1998). Expression and cellular localization of *Trypanosoma cruzi* type II DNA topoisomerase. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.94, p.197-204,
- Freytmuller E, Camargo EP. (1981). Ultrastructural differences between species of trypanosomatids with and without endosymbionts. *J Protozool.*;28(2):175-82.
- Fricke, W.M., Kaliraman, V. and Brill, S.J. (2001) Mapping the DNA topoisomerase III binding domain of the Sgs1 DNA helicase. *J. Biol. Chem.*, 276, 8848–8855.
- Garcia-Bustos J, Heitman J, Hall MN. (1991). Nuclear protein localization. *Biochim Biophys Acta.* 7;1071(1):83-101.

Gartenberg, M.R. and Wang, J.C. (1992) Positive supercoiling of DNA greatly diminishes mRNA synthesis in yeast. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89, 11461-11465

Gaziova I, Lukes J. (2003). Mitochondrial and nuclear localization of topoisomerase II in the flagellate *Bodo saltans* (Kinetoplastida), a species with non-catenated kinetoplast DNA. *J Biol Chem.* 28;278(13):10900-7.

Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H. & Nash, H. A. (1976) DNA Gyrase: An Enzyme that Introduces Superhelical Turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3872-3876

Goodwin, A., Wang, S.W., Toda, T., Norbury, C. and Hickson, I.D. (1999) Topoisomerase III is essential for accurate nuclear division in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.*, 27, 4050-4058

GONZALES-PERDOMO, M.; CASTRO, S.L.; MEIRELLES, M. N. S. L.; GOLDENBERG, S. *Trypanosoma cruzi* proliferation and differentiation are blocked by topoisomerase II inhibitors **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.34, p.1707-14, 1990.

HANKE T, RAMIRO MJ, TRIGUEROS S, ROCA J, LARRAGA V. (2003). Cloning, functional analysis and post-transcriptional regulation of a type II DNA topoisomerase from *Leishmania infantum*. A new potential target for anti-parasite drugs. *Nucleic Acids Res.* 15;31(16):4917-28.

Hiasa H, Marians KJ. 1994 . Topoisomerase III, but not topoisomerase I, can support nascent chain elongation during theta-type DNA replication. *J Biol Chem.* Dec 23;269(51):32655-9.

Higgins NP, Peebles CL, Sugino A, Cozzarelli NR. (1978). Purification of subunits of *Escherichia coli* DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr;75(4):1773-7.

Hines JC, Ray DS. (1997). Periodic synthesis of kinetoplast DNA topoisomerase II during the cell cycle. *Mol Biochem Parasitol.* 88(1-2):249-52.

Horton P, Nakai K. 1997 Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.*;5:147-52.

Horowitz DS, Wang JC. (1987). Mapping the active site tyrosine of *Escherichia coli* DNA gyrase. *J Biol Chem.* 15;262(11):5339-44.

Iborra FJ, Jackson DA, Cook PR. (2001). Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science*. Aug 10;293(5532):1139-42. Epub 2001 Jun 21.

ISABELA, P.; CAPRANICO, G. & ZUNINO, F. The role of Topoisomerase II in drug resistance. *Life Sci*. v.48, p.2195-2205. 1991.

Jannick Dyrlov Bendtsen, Henrik Nielsen, Gunnar von Heijne and Søren Brunak (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. J. Mol. Biol., 340:783-795,

Jenson, S., Andersen, A.H., Kjeldsen, E., Biersack, H., Olsen, E.H.N., Andersen, T.B., Westergaard, O. and Jakobsen, B.K. (1996) Analysis of functional domain organisation in DNA topoisomerase II from humans and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 3866–3877

KAYSER, K; MURRAY, N. E. (1985). **The use of phage λ replacement vectors in the construction of representative genomic DNA libraries.** In: DNA cloning – practical approach. vol. I. p. 1-47. (Glover, D. M., ed.), IRL Press, Oxford.

KARLINSEY, J.; STAMATOYANNOPOULOS; NVER, T. (1989). Simultaneous purification of DNA and RNA from small number of eukaryotic cells. *Anal. Biochem*. v. *180*, p.303-306.

Keeney S, Giroux CN, Kleckner N. 1997. *Cell* 88:375–84

Keeney S, Kleckner N. 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11274–78

Keeney, S. 2001. Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 52:1-53

Kim RA, Wang JC. 1989 Function of DNA topoisomerases as replication swivels in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*. Jul 20;208(2):257-67.

KOVALIC, D.; KWAK, J. H.; WEISBLUM, B. General method for direct cloning of DNA fragment generated by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*. v.19, p.4560-4564, 1991.

Krah, R., Kozyavkin, S.A., Slesarev, A.I., Gellert, M. (1996). A two-subunit type I DNA topoisomerase (reverse gyrase) from an extreme hyperthermophile. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 106-110)

LEHRACH, H.; DIAMOND, D.; EY, J. M.; BOEDTKERR, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions: a critical reexamination. *Biochemistry*, v.16, p.4743-4751.

Liu LF, Depew RE, Wang JC.(1976).Knotted single-stranded DNA rings: a novel topological isomer of circular single-stranded DNA formed by treatment with Escherichia coli omega protein.J Mol Biol.15;106(2):439-52.

LIU, L. F. (1989). DNA topoisomerases poisons as antitumor drugs. **Ann. Rev. Biochem.** v.58, p. 351-357.

Liu,L.F. and Wang,J.C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 84, 7024±7027.

Lynch AS, Wang JC.(1993). Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I. J Bacteriol. Mar;175(6):1645-55.

Maftahi,M., Han,C.S., Langston,L.D., Hope,J.C., Zigouras,N. and Freyer,G.A. (1999) The top3(+) gene is essential in *Schizosaccharomyces pombe* and the lethality associated with its loss is caused by Rad12 helicase activity. *Nucleic Acids Res.*, 27, 4715–4724

Marchler-Bauer A, Bryant SH (2004), "*CD-Search: protein domain annotations on the fly.*", **Nucleic Acids Res.** 32:W327-331.

Melendy T, Ray DS. (1989) Novobiocin affinity purification of a mitochondrial type II topoisomerase from the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*.J Biol Chem. 25;264(3):1870-6.

Mirski SE, Gerlach JH, Cole SP. 1999.*Exp. Cell Res.* 251:329–39

Mondal,N. and Parvin,J.D. (2001) DNA topoisomerase IIalpha is required for RNA polymerase II transcription on chromatin templates. Nature, 413, 435-438.

Osheroff N, Shelton ER, Brutlag DL. 1983. *J. Biol. Chem.* 258:9536–43

Pasion SG, Hines JC, Aebersold R, Ray DS. (1992). Molecular cloning and expression of the gene encoding the kinetoplast-associated type II DNA topoisomerase of *Crithidia fasciculata*.Mol Biochem Parasitol.50(1):57-67.

Pestov DG, Gladkaya LA, Maslov DA, Kolesnikov AA.(1990).Characterization of kinetoplast minicircle DNA in the lower trypanosomatid *Crithidia oncopelti*.Mol Biochem Parasitol.;41(1):135-45.

Postow L, Crisona NJ, Peter BJ, Hardy CD, Cozzarelli NR. 2001.Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork.Proc Natl Acad Sci U S A. Jul 17;98(15):8219-26.

RIGBY, P. W. J., DIECKMANN, M., RHODES, C. & BERG, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick-translation with DNA polymerase I. **J. Mol. Biol.** v.13, p.237-251.

Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*. 8;64(3):615-23

Roca J, Wang JC. (1994). *Cell* 77:609–16

Rucker E, Schneider G, Steinhauser K, Lower R, Hauber J, Stauber RH. (2001). Rapid evaluation and optimization of recombinant protein production using GFP tagging. *Protein Expr Purif.*(1):220-3.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning : A laboratory manual* . Cold Spring Harbor, N.Y, USA

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.74, p.5463-5467

SCHNEIDER, E.; HSIANG, Y-H & LIU, L. F. DNA topoisomerases as anticancer drug targets. **Adv. Pharmacol.** v.21, p.149-183. 1989

Sengupta T, Mukherjee M, Mandal C, Das A, Majumder HK. (2003). Functional dissection of the C-terminal domain of type II DNA topoisomerase from the kinetoplastid hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Nucleic Acids Res.* 15;31(18):5305-16.

Shlomai, j.(1994). The assembly of kinetoplast DNA. *Parasitol. Today* 10 (9):341-343

Shaiu WL, Hu T, Hsieh TS. 1999. *Pac.Symp. Biocomput.*, pp. 578–89

Shapiro TA. (1993). Kinetoplast DNA maxicircles: networks within networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15;90(16):7809-13

SHAPIRO TA, SHOWALTER AF.(1994). In vivo inhibition of trypanosome mitochondrial topoisomerase II: effects on kinetoplast DNA maxicircles. *Mol Cell Biol.*14(9):5891-7.

SHAPIRO T.A.; ENGLUND P.T.,(1995). The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol.*49:117-43.

- Simpson L, Thiemann OH, Savill NJ, Alfonzo JD, Maslov DA. (2000). Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20;97(13):6986-93
- SOUTHERN, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J.Mol.Biol.** v.98, p.503-517.
- Swanberg SL, Wang JC. (1987). Cloning and sequencing of the *Escherichia coli* *gyrA* gene coding for the A subunit of DNA gyrase. *J Mol Biol.* 20;197(4):729-36.
- Strauss PR, Wang JC. (1990). The TOP2 gene of *Trypanosoma brucei*: a single-copy gene that shares extensive homology with other TOP2 genes encoding eukaryotic DNA topoisomerase II. *Mol Biochem Parasitol.* 1;38(1):141-50.
- Thrash C, Bankier AT, Barrell BG, Sternglanz R. 1985. Cloning, characterization, and sequence of the yeast DNA topoisomerase I gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul;82(13):4374-8.
- TOWBIN, H.; STAEBLIN, T.; BORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc.Nat.Acad.Sci. USA**, v.76, p.4350-4354.
- Tse, Y. & Wang, J. C. (1980). *E. coli* and *M. luteus* DNA topoisomerase I can catalyze catenation or decatenation of double-stranded DNA rings. *Cell* **22**, 269–276
- Uemura T, Morino K, Uzawa S, Shiozaki K, Yanagida M. 1987. Cloning and sequencing of *Schizosaccharomyces pombe* DNA topoisomerase I gene, and effect of gene disruption. *Nucleic Acids Res.* Dec 10;15(23):9727-39.
- UEMURA T, YANAGIDA M. 1984. Isolation of type I and II DNA topoisomerase mutants from fission yeast: single and double mutants show different phenotypes in cell growth and chromatin organization. *EMBO J.* Aug;3(8):1737-44.
- Vallejo GA, Macedo AM, Chiari E, Pena SD. (1994). Kinetoplast DNA from *Trypanosoma rangeli* contains two distinct classes of minicircles with different size and molecular organization. *Mol Biochem Parasitol.*;67(2):245-53.
- Verner K, Schatz G. (1988). Protein translocation across membranes. *Science.* 241(4871):1307-13.

- VOSBERG, H-P. DNA topoisomerases: enzymes that control DNA conformation. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** v.114, p.19-102. 1985.
- Wallis,J.W., Chrebet,G., Brodsky,G., Rolfe,M. and Rothstein,R. (1989) A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell*, 58, 409–419
- Wang JC, Caron PR, Kim RA.1990. The role of DNA topoisomerases in recombination and genome stability: a double-edged sword? *Cell*. Aug 10;62(3):403-6.
- Wang JC. 1998. *Q. Rev. Biophys.* 31:107–44
- WANG Z, ENGLUND PT.(2001).RNA interference of a trypanosome topoisomerase II causes progressive loss of mitochondrial DNA. *EMBO J.*Sep 3;20(17):4674-83.
- WANG, J. C. DNA topoisomerases (1985). **Ann. Rev. Biochem.** v.54, p.665-697.
- WANG, C. J. 2002. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Jun;3(6):430-40. Review.
- Wang, J. C. (1971). Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein. *J. Mol. Biol.* **55**, 523–533
- Wang, J. C. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 635–692 (1996).
- WARREN, L. G. (1960). Metabolism of *Schizotripanum cruzi*, Chagas, I.: Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. *J. Parasitol.* 46: 529-539
- Wiedemann N, Frazier AE, Pfanner N. (2004). The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem.* 9;279(15):14473-6.
- Worland ST, Wang JC.(1989). Inducible overexpression, purification, and active site mapping of DNA topoisomerase II from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*264(8):4412-6.
- Wu,L. and Hickson,I.D. (2001) RecQ helicases and topoisomerases: components of a conserved complex for the regulation of genetic recombination. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58, 894–901
- Zhang H, D'Arpa P, Liu LF.(1990). A model for tumor cell killing by topoisomerase poisons. *Cancer Cells.*;2(1):23-7.

Zhang CX, Chen AD, Gettel NJ, Hsieh TS. 2000. Essential functions of DNA topoisomerase I in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* Jun 1;222(1):27-40.

Zhu Q, Pongpech P, DiGate RJ. 2001 Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 14; 98(17): 9766-9771.

ZIJLSTRA, J. G.; DE JONG, S.; DE VRIES, G. E. & MULDER, N. H. Topoisomerases, new targets in cancer chemotherapy. **Med. Oncol. Tumor Pharmacother.** v.7, p.11-18. 1990.