UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Tese de Doutorado

DUPLO PAPEL DA PROTEÍNA MSH2 NO REPARO DE ERROS DE PAREAMENTO NO DNA E NA RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO EM TRIPANOSOMATÍDEOS

Doutoranda: Viviane Grazielle da Silva

Orientador: Prof. Dra Santuza Teixeira

Co-orientador: Prof. Dr Carlos Renato Machado

Colaborador: Prof. Dr. Richard McCulloch
(University of Glasgow)

Belo Horizonte, MG

2015

Viviane Grazielle da Silva

DUPLO PAPEL DA PROTEÍNA MSH2 NO REPARO DE ERROS DE PAREAMENTO NO DNA E NA RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO EM TRIPANOSOMATÍDEOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós- graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais

Orientador: Prof. Dra Santuza Teixeira
Co-orientador: Prof. Dr Carlos Renato Machado
Colaborador: Prof. Dr. Richard McCulloch
(University of Glasgow)

Belo Horizonte, MG

2015

Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE VIVIANE GRAZIELLE DA SILVA. **Aos nove dias do mês de março de 2015 às 13:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Duplo papel da proteína MSH2 no reparo de erros de pareamento no DNA e na resposta ao estresse oxidativo em Tripanosomatídeos", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Biologia Molecular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profª. Santuza Maria Ribeiro Teixeira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Fabiana Simão Machado (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Silvane Maria Fonseca Murta (Centro de Pesquisa Rene Rachou-FIOCRUZ-B), aprovada; Dra. Maria Carolina Quartim Barbosa Elias Sabbaga (Instituto Butantan), aprovada; Dr. Sérgio Schenkman (Universidade de São Paulo), aprovada; Dr. Carlos Renato Machado - Co-orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 09 de março de 2015.**

Dra. Fabiana Simão Machado (UFMG)

Dra. Silvane Maria Fonseca Murta (Centro de Pesquisa Rene Rachou-FIOCRUZ-B)

Dra. Maria Carolina Quartim Barbosa Elias Sabbaga (Instituto Butantan)

Dr. Sérgio Schenkman (Universidade de São Paulo)

Dr. Carlos Renato Machado - Co-orientador (UFMG)

Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira - Orientadora (UFMG)

Prof. Jader dos Santos Cruz
Coordenador do Curso de Pós Graduação
em Bioquímica e Imunologia
ICB - UFMG

“Aprender é a única coisa de que a mente
nunca se cansa, nunca tem medo e
nunca se arrepende.”
Leonardo da Vinci

Ao meu querido amigo Juliano
Leal de Paula.

Agradecimentos

À minha orientadora, Profª Santuza, por todos os anos de convivência, desde a iniciação científica até hoje. Por sempre ter mantido a porta da sua sala aberta para qualquer discussão (de experimento ou não). Pelo apoio e ajuda na decisão de fazer Doutorado Sanduíche. Por toda a contribuição para o meu amadurecimento científico.

Ao Prof. Carlos Renato pela co-orientação. Por estar sempre disposto a discutir qualquer resultado. Pelas sugestões nos experimentos e pela empolgação com os resultados, que sempre nos faz querer ir mais longe.

To Richard for welcoming me in his Lab. For all the support and supervision while I was in Glasgow. It was a life changing experience, not only personally, but it changed my way to see Science.

À Ceres e à Priscila pela ajuda com os experimentos.

À profª Patiu pela divisão do espaço do Lab e por sempre ter uma crítica construtiva.

Ao Wanderson por sempre ter "aquele" plasmídeo e toda ajuda laaaá do Paraná.

À Dra Silvane Murta por gentilmente nos ceder um pouco do anticorpo anti-FeSOD-A.

Ao Juliano pela amizade e reações de sequenciamento.

Ao Elimar por todo o apoio técnico e por estar sempre disposto a nos ajudar.

A todos os amigos do Lab. É lá que passamos a maior parte do nosso dia. Brincadeiras, risadas e broncas fazem parte da rotina de qualquer família ;) Gabi, Nati, Juli, Lu, Fer, Camila, Júlia, Pri, Mari, Tais, Nailma, Leti, Rondon, Bruna, Rita, Nina, Jarina, Bah e a todos que já passaram pelo Lab...

Aos meus amigos por todos os "Hoje eu não posso" ou "Estou muito cansada para sair hoje". Para conquistar algumas coisas precisamos abrir mão de outras.

To all the people who made me miss the life in Glasgow so much: Mari, Tiago, Fernando, Elena, Ana (the Family), Cat, Becky, Craig, Marko, Dan, Amy, Sam, Elizabeth, Nath and everyone from Level 6, Stu, Luke, Nicky... For all the help with the experiments or just having a good time outside the Lab!

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós- Graduação em Bioquímica e Imunologia, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao CNPq e Capes pela concessão da bolsa de estudo.

À minha família por serem sempre o meu suporte. À minha mãe, Marize, por todo apoio, carinho, compreensão e por nunca me deixar desistir. Por ter sempre aquele abraço gostoso no final de um dia bom ou ruim. Simplesmente por ser mãe e acreditar muito mais do que eu na minha capacidade. Ao meu irmão e ao meu pai, mesmo distantes, na torcida constante. Às vovós, titia(o)s, prima(o)s etc que mesmo sem entenderem o que fazemos ficam no maior orgulho.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo:

Diversos mecanismos estão envolvidos na manutenção da integridade genômica de qualquer organismo, entre eles o Sistema de Reparo de Erros de Pareamento (MMR). Responsável principalmente pelo reconhecimento de erros de pareamento e alças de inserção e deleção que podem ocorrer após a replicação do DNA, o principal componente do MMR é formado pelas proteínas MutS e MutL encontradas em procariotos e diversas proteínas MSH e MLH presentes em eucariotos. Estudos anteriores voltados para a caracterização da via de MMR nos tripanosomatídeos *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* revelaram dados sugerindo o envolvimento dessas proteínas também na resposta aos danos oxidativos no DNA. Em *T. cruzi* a análise da sequência da proteína MSH2 em diferentes cepas do parasito mostrou a existência de três diferentes isoformas da proteína na população do parasito. Para investigar o papel dessa proteína, foram produzidas linhagens de epimastigotas de *T. cruzi* nas quais um ou ambos os alelos do gene *msh2* foram deletados. Uma vez que clones contendo a deleção de um dos alelos mostraram-se mais susceptíveis ao tratamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), foi sugerido o envolvimento dessa proteína na resposta ao dano oxidativo no DNA. Resultado semelhante foi observado para clones nocautes de *msh2* em *T. brucei:* formas sanguíneas nas quais um ou ambos alelos de *msh2* foram deletados mostraram-se mais susceptíveis ao tratamento com H_2O_2 quando comparados aos parasitos selvagem. Por outro lado, surpreendentemente, linhagens de epimastigotas de *T. cruzi* contendo a deleção dos dois alelos de *msh2,* assim como as linhagens nocaute de *msh2* geradas nas formas procíclicas de *T. brucei*, apresentaram maior resistência ao tratamento com H_2O_2 quando comparados aos parasitos selvagens. No *T. cruzi* a deleção dos dois alelos do gene *msh2* resultou também em uma maior capacidade de sobrevivência no interior de macrófagos, uma célula capaz de gerar altos níveis de espécies reativas de oxigênio. Com a finalidade de avaliar se a proteína MSH2 estaria envolvida na resposta ao estresse oxidativo de uma maneira independente de outras proteínas do MMR foram gerados clones de *T. cruzi msh6* heminocautes, os quais apresentaram também uma maior susceptibilidade ao estresse oxidativo. A localização nuclear das duas proteínas MSH2 e MSH6 foi obtida por meio da análise de microscopia de fluorescência dessas proteínas em fusão com tag de c-myc e HA ou RFP em parasitos transfectados. Proteínas capazes de interagir com o MSH2 foram investigadas por meio da geração de parasitos nos quais a proteína TbMSH6 foi expressa

com um *tag* de HA e a proteína MSH2 expressa com um *tag* de myc. Ensaios de co-imunoprecipitação com esses parasitos mostraram que a proteína MSH2 de *T. brucei* interage com MSH3 e MSH6, como esperado, porém não revelaram nenhuma interação adicional com outras proteínas mesmo após tratamento com agentes genotóxicos como o MNNG e H_2O_2. Tomados em conjunto, os nossos dados nos levaram a formular a hipótese de que a deleção dos dois alelos de *msh2* nas formas epimastigotas de *T. cruzi* e nas formas procíclicas de *T. brucei* teriam maior impacto sobre a capacidade desses parasitos de resistir ao estresse oxidativo gerado pelo metabolismo essencialmente aeróbico dessas formas, as quais estão presentes nos vetores invertebrados desses parasitos. As diferenças no fenótipo dos mutantes de *msh2* observadas nas formas sanguíneas do *T. brucei*, poderiam ser explicadas pelas diferenças no metabolismo dessas formas, o qual, em contraste com as formas procíclicas, é anaeróbico e gera, portanto, menos ROS. A hipótese de que os mutantes de *msh2* na forma procíclica tenham que se adaptar para sobreviver na ausência de MSH2 foi corroborada pela análise comparativa da expressão gênica global que mostrou a diminuição nos níveis da enzima Fumarato Redutase NADH-dependente, envolvida na geração de ROS em linhagens *msh2* nocaute de *T. brucei*.

Abstract

Different mechanisms are involved in maintaining genomic stability; among them is the DNA Mismatch Repair (MMR). Mainly responsible for the recognition of mismatches and insertion/deletion loops after DNA replication, the main component of MMR is formed by MutS and MutL proteins that are found in prokaryotes and different MutS homologs (MSH) e MutL homologs (MLH), present in eukaryotes. Previous studies aiming to characterize the MMR pathway in the trypanosomatide parasites *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* provided data suggesting the involvement of these proteins also in the response to DNA oxidative damages. In *T. cruzi*, sequence analysis of MSH2 from different strains of the parasite showed the existence of three different isoforms of this protein in the parasite population. With the aim of further investigate the role of this protein, we generated lineages of epimastigote forms of *T. cruzi* with one or both alleles of *msh2* gene deleted. Clones with one allele *msh2* deleted showed increased susceptibility to hydrogen peroxide (H_2O_2) treatment, suggesting the involvement of this protein in the response to DNA oxidative damage. Similar results were observed for *msh2* knockouts in *T. brucei*: bloodstream forms with one or two alleles of *msh2* deleted showed increased susceptibility to H_2O_2 when compared to wild type parasites. However, similar to *msh2* null mutants generated in the procyclic form of *T. brucei*, *T. cruzi* lineages with both *msh2* alleles deleted showed increased tolerance to H_2O_2 treatment when compared to wild type parasites. *T. cruzi msh2* null mutants also have increased capacity to survive to intracellular reactive oxygen species generated during macrophages infection. With the aim of evaluating whether MSH2 is involved in the oxidative stress response in a way that is independent of other MMR proteins, *T. cruzi* single allele *msh6* knockouts were also generated. These *T. cruzi msh6* mutants were also more susceptible to oxidative stress. A nuclear localization of the two proteins, MSH2 and MSH6, were obtained by fluorescence microscopy analysis of c-myc tag and HA tag or RFP fused to these proteins in transfected parasites. Proteins with the capacity to interact with MSH2 were investigated using parasites expressing TbMSH6 in fusion with a HA tag, and TbMSH2 expressed with a myc tag. Co-immunoprecipitation assays with parasites expressing the tagged proteins showed that *T. brucei* MSH2 interacts with MSH3 and MSH6, as expected, but no additional interactions were observed even after treatment with genotoxic agents such as MNNG and H_2O_2. Taken together our results lead us to formulate the hypothesis that the deletion of

two alleles of *msh2* in epimastigote form of *T. cruzi* and procyclic form of *T. brucei* has a strong impact on the capacity of these parasites to resist to the oxidative stress generated by its essentially aerobic metabolism. Differences in the phenotype of *msh2* mutants observed in the bloodstream form of *T. brucei* could be explained by metabolic differences, since this form, in contrast to procyclic forms, has an anaerobic metabolism, which generate less ROS. The hypothesis that procyclic *msh2* mutants had to adapt to survive in the absence of MSH2 was corroborated by the comparative analysis of global genic expression that showed a reduced expression of the enzyme NADH-dependent fumarate reductase in the mutants compared to WT parasites, an enzyme involved in ROS generation.

Sumário

Lista de Figuras e Tabelas X

Lista de abreviaturas XI

1. Introdução 1
   1.1- *T. cruzi* e *T. brucei*: kinetoplastídeos causadores de doenças humanas 1
   1.2- O genoma e a expressão gênica em tripanosomatídeos 6
   1.3- Manipulação gênica em tripanosomatídeos: 9
   1.4- Sistemas de reparo de DNA em tripanosomatídeos e o papel do MMR na geração de variabilidade genética no *T. cruzi*. 12
   1.5- O papel do MMR na resposta ao estresse oxidativo em tripanosomatídeos 19
   1.6- Proteínas envolvidas na resposta anti-oxidante em Tripanosomatídeos: 21

2. Objetivos 29
   2.1- Objetivo Geral 29
   2.2- Objetivos Específicos 29

3- Metodologia 31
   3.1- Cultivo de parasitos 31
   3.2- Transfecção de parasitos: 31
   3.3- Tratamento com agentes genotóxicos 33
   3.4- Microscopia de fluorescência 34
   3.5- Infecção *in vitro* com *T. cruzi* 35
   3.6- Co- imunoprecipitação 36
   3.7- Purificação de DNA Plasmidial 37
   3.8- Reações de digestão enzimática 37
   3.9- Purificação de fragmentos obtidos por PCR ou digestão enzimática e ligação em plasmídeos 37
   3.10- Transformação bacteriana 38
   3.11- Construção dos vetores para obtenção de parasitos nocautes e para localização de proteínas: 38
   3.12- Detecção de 8-oxoguanina: 43
   3.13- RNAseq 44
   3.14- Real Time PCR: 44

4. Resultados 46
   4.1- Geração de linhagens de *T. cruzi* nocautes do gene *msh2* 46
   4.2- Resposta de parasitos *Tcmsh2* nocautes a agentes genotóxicos 50
   4.3- Resposta de parasitos *msh2* nocautes ao estresse oxidativo 55
   4.4- Alterações na infectividade de *T. cruzi msh2* nocaute 57
   4.5- Acúmulo de lesões oxidativas no DNA de parasitos *msh2* nocautes 59
   4.6- Análise do transcriptoma de parasitos *msh2* nocautes em *T. brucei* 62
   4.7- Expressão de enzimas envolvidas da resposta ao estresse oxidativo em nocautes de MSH2 em *T. cruzi* 64
   4.8- Caracterização das proteínas que interagem com MSH2 em *T. brucei* e *T. cruzi* 70
   4.9- Localização subcelular de MSH2 82
   4.10- Geração de nocautes para MSH6 em *T. cruzi* 84
   4.11- Resposta de parasitos *Tcmsh6* nocautes a agentes genotóxicos 87
   4.12- Localização de TcMSH6 89

5- Discussão 91

6- Conclusão 114

7- Perspectivas 115
8- Referências Bibliográficas 116
Anexo 1 130
Anexo 2 169
Anexo 3 187

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1: Ciclo de vida dos tripanosomatídeos *T. brucei* e *T. cruzi*..... 3
Figura 2: Organização do genoma e mecanismo de processamento pós-transcricional em tripanossomatídeos. 8
Figura 3: O Sistema de Reparo de Erros de Pareamento em procariotos e eucariotos. 13
Figura 4: Metabolismo anti-oxidativo em tripanosomatídeos..... 24
Figura 5: Representação esquemática da estratégia utilizada para gerar parasitos com os dois alelos de *Tcmsh2* deletados. 50
Figura 6: Análises de parasitos *Tcmsh2* nocautes. 52
Figura 7: Crescimento de *Tcmsh2* nocautes frente a agentes genotóxicos. 54
Figura 8: Resposta de *msh2* nocautes em *T. cruzi* ao estresse oxidativo gerado por H_2O_2. 56
Figura 9: Infectividade de *Tcmsh2* nocautes. 58
Figura 10: Detecção de 8-oxoG no DNA de tripanosomas..... 60
Figura 11: Avaliação da expressão de FRD em *T. brucei* e *T. cruzi*……... 67
Figura 12: Avaliação da expressão de enzimas da resposta ao estresse oxidativo nos nocautes de *msh2* em *T. cruzi*. 69
Figura 13: Estratégia utilizada na recombinação do vetor para expressão de MSH6 com *tag* 6-HA..... 72
Figura 14: Caracterização de clones da forma sanguínea de *T. brucei* expressando MSH6:HA. 73
Figura 15: Co- imunoprecipitação de TbMSH2 na forma sanguínea. 75
Figura 16: Co- imunoprecipitação de TbMSH2 na forma procíclica..... 77
Figura 17: *Western blot* de formas epimastigotas de *T. cruzi* expressando MSH2 em fusão com *myc tag*. 80
Figura 18: Co- imunoprecipitação de TcMSH2 fusionado a tag de myc. 81
Figura 19: Localização celular de MSH2: Parasitos *T. cruzi* na forma epimastigota 83
Figura 20: Análise de parasitos TcMSH6 heminocautes. 86
Figura 21: Tratamento de *T. cruzi msh6* heminocautes com agentes genotóxicos 88
Figura 22: Localização subcelular de TcMSH6. 90
Figura 23: O MSH2 como moléculas sinalizadora de estresse oxidativo. 93
Figura 24: Predição de sinal mitocondrial para TcMSH4. 103
Figura 25: Metabolismo de D-glicose e L-prolina na forma procíclica de *T. brucei*..... 111

Tabela 1: Descrição de sequencia dos iniciadores utilizados no trabalho……43
Tabela 2: RNAseq de parasitos *msh2* nocautes…….. 61

Lista de abreviaturas

8-oxoG – 8-oxoguanina

AP – sítios abásicos

APX – Ascorbato peroxidase

ATP – adenosina trifosfato

BER – reparo de excisão de base, do inglês *base excision repair*

CPX – triparedoxina peroxidase citoplasmática

DNA – ácido desoxirribonucléico

dsRNAs – RNAs dupla fita, do inglês *double strand RNAs*

DTU - Unidade Discreta de Tipagem, do ingles *discrete typing units*

ES - sítio de expressão, do inglês *expression site*

H_2O_2 – peróxido de hidrogênio

IDL – alça de inserção/deleção

IR – região intergênica, do ingles *intergenic region*

MASPs – proteínas de superfície associadas às mucinas, do inglês *mucin-associated surface proteins*

MLH – homólogo de MutL

MMR – reparo de erros de pareamento, do inglês *mismatch repair*

MNNG - *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine*

MPX – triparedoxina peroxidase mitocôndrial

mRNAs – RNAs mensageiros

MSH – homólogo de MutS

MutH – proteína H do MMR de Procariotos

MutL – proteína L do MMR de Procariotos

MutLα – heterodímero formado por MLH1 e PMS2 em eucariotos

MutLβ – heterodímero formado por MLH1 e PMS1 em eucariotos

MutLγ – heterodímero formado por MLH1 e MLH3 em eucariotos

MutS – proteína S do MMR de procariotos

MutSα – heterodímero formado por MSH2 e MSH6 em eucariotos

MutSβ – heterodímero formado por MSH2 e MSH3 em eucariotos

NER – reparo de excisão de nucleotídeo, do inglês *nucleotide excision repair*

$O_2^{\bullet}$ – ânion superóxido

O^6-MeG - O^6-metilguanina

RNA – ácido ribonucleico

rRNAs – RNAs ribossômicos

siRNAs – pequenos RNAs de interferência, do inglês *small interfering RNAs*

SL – *spliced leader*

SOD – superóxido dismutase

SSB – proteína de ligação a fita simples, do inglês *Single-Stranded DNA Binding protein*

$T[SH]_2$ – tripanotiona

TPX – triparedoxina

TR – tripanotiona redutase

TS – tripanotiona sintase

TXNs – triparedoxinas

UTR – região não traduzida, do inglês *untranslated region*

VSG - glicoproteínas variantes de superfície, do inglês *variant surface glycoproteins*

1. Introdução

1.1- *T. cruzi* e *T. brucei*: kinetoplastídeos causadores de doenças humanas

Os parasitos *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* são protozoários hemoflagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, causadores da doença de Chagas e da Tripanosomíase africana (ou doença do Sono), respectivamente. Nessa ordem também estão incluídos outros parasitos causadores de doenças, como as várias espécies do gênero *Leishmania*, responsáveis pelas diferentes formas clínicas da Leishmaniose e protozoários que não são parasitos humanos. Dados epidemiológicos estimam que existam 10 milhões de pessoas vivendo com a doença de Chagas na América Latina, além de mais de 300 mil casos relatados em outras regiões do mundo (Hotez *et al.*, 2012). Já a Tripanosomíase africana é predominante na África sub-Sahariana, onde estima-se que ocorrem anualmente 70 mil casos de novas infecções e que 60 milhões de pessoas estejam vivendo sob o risco de infecção (Fèvre *et al.*, 2008).

Uma característica marcante comum a esses protozoários é a presença de uma organela exclusiva denominada cinetoplasto, da qual deriva o nome da ordem: "kinetoplastida". É no cinetoplasto que está concentrado o genoma mitocondrial (denominado kDNA) da mitocôndria única encontrada nos parasitos pertencentes a essa ordem (Donelson, Gardner e El-Sayed, 1999). Outra característica peculiar é a extensiva edição do RNA mitocondrial. Trata-se de uma modificação pós-transcricional na qual resíduos de uridina (U) são inseridos ou deletados em regiões codificadoras do RNA mitocondrial, de maneira a corrigirem a fase de leitura e produzirem RNAs mensageiros (mRNAs) passíveis de serem traduzidos (Simpson *et al.*, 2000). Outras características comuns e peculiares a esses organismos serão relatadas adiante.

Esses parasitos apresentam diferentes formas morfológica e bioquímicamente distintas que se adaptam às mudanças de hospedeiro pelas quais passam ao longo do seu ciclo de vida. Na **Figura 1** está a representação do ciclo de vida do *T. cruzi* e *T. brucei*. A infecção no hospedeiro invertebrado é iniciada no momento do repasto sanguíneo quando o inseto, mosca tsétsé (gênero Glossina) no caso do *T. brucei* ou o barbeiro triatomíneo no caso do *T. cruzi*, ingerem sangue contendo formas sanguíneas circulantes denominadas formas tripomastigotas (*T. cruzi*) ou *bloodstream* (*T. brucei*). No interior do trato gastrointestinal do inseto a forma sanguínea curta (*bloodstream stump*) não replicativa de *T. brucei* diferencia-se em forma procíclica replicativa, seguida da diferenciação para forma epimastigota replicativa na glândula salivar e finalmente em formas metacíclicas infectantes. Já no trato gastrointestinal do barbeiro triatomíneo as tripomastigotas não-replicativas de *T. cruzi* ingeridas diferenciam-se em epimastigotas replicativas e na porção final do intestino do inseto, diferenciam-se em formas metacíclicas infectantes. O ciclo é reiniciado no momento de um novo repasto sanguíneo. As formas metacíclicas infectantes de *T. brucei* são injetadas no novo hospedeiro vertebrado juntamente com a saliva da mosca tsétsé. Ao atingirem a corrente sanguínea do hospedeiro diferenciam-se em formas *bloodstream sleender* ou formas sanguíneas longas replicativas; o aumento do número dessas formas sinaliza para a diferenciação em formas sanguíneas curtas não replicativas. Já no caso do *T. cruzi* as formas tripomastigotas metacíclicas são eliminadas com as fezes do barbeiro hematófago no momento da picada e penetram a pele até atingirem a corrente sanguínea. Diferente do *T. brucei* que não apresenta um estágio de diferenciação intracelular, as formas tripomastigotas de *T. cruzi* não replicativas invadem diferentes tipos celulares no hospedeiro, onde diferenciam-se em formas amastigotas que replicam no citoplasma da célula.

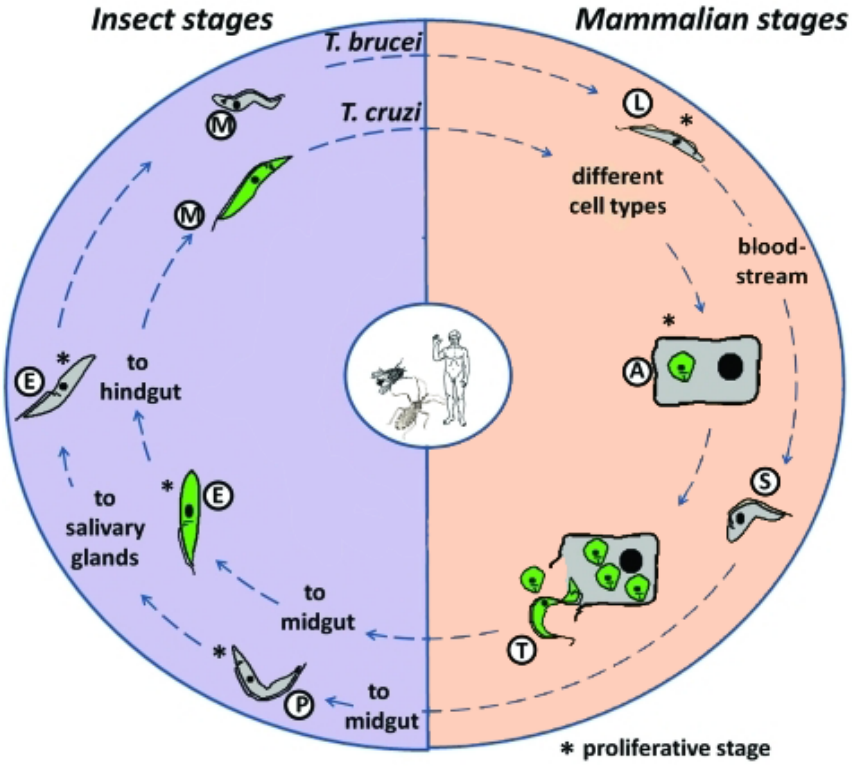


Figura 1: Ciclo de vida dos tripanosomatídeos *T. brucei* e *T. cruzi*. Apesar de apresentarem várias características comuns, a diferença mais marcante está na ausência de um estágio intracelular em *T. brucei*. As formas sanguíneas longa (L) e curta (S) circulam livremente na corrente sanguínea e podem ser ingeridas pela mosca tsétsé onde diferenciam-se em formas procíclica (P), epimastigota (E) e metacíclica (M). No *T. cruzi*, entretanto, a forma sanguínea invade diferentes tipos celulares onde diferenciam-se em amastigotas (A) e replicam até uma nova etapa de diferenciação em formas tripomastigotas (T) que romperão as células e serão novamente liberadas na corrente sanguínea. As tripomastigotas (T) ingeridas pelo barbeiro hematófago irão se diferenciar em formas epimastigota (E) e na porção final do intestino em tripomastigotas metacíclicas. Modificado de Teixeira *et al.*, 2012.

Antes de retornarem à corrente sanguínea as formas amastigotas, agora em maior número, diferenciam-se novamente em formas tripomastigotas, que finalmente rompem a célula e retornam à corrente sanguínea onde podem invadir uma nova célula ou serem ingeridas por um barbeiro triatomíneo, reiniciando o ciclo (Brener, 1973; Naula, Parsons e Mottram, 2005; De Souza, De Carvalho e Barrias, 2010).

Com um sofisticado mecanismo de escape do sistema imune do hospedeiro a forma sanguínea de *T. brucei* periodicamente altera a expressão de glicoproteínas variantes de superfície (VSG – do inglês *variant surface glycoproteins*). Os genes codificadores das VSGs estão presentes em unidades transcricionais subteloméricas, denominadas sítios de expressão (ES) de VSGs, e são ativamente transcritos pela RNA Polimerase I na forma sanguínea e silenciados na forma procíclica. A variação antigênica em *T. brucei* envolve a mudança de expressão para uma VSG distinta. A região subtelomérica é altamente instável e sujeita a quebras espontâneas no DNA. Um mecanismo de recombinação que pode ser dependente ou independente de RAD51 é responsável pela substituição da VSG e perda do sítio de expressão (ES) (Glover, Alsford e Horn, 2013; Horn, 2014).

Embora *T. cruzi* não tenha um mecanismo de evasão do sistema imune similar ao da troca de VSG, na superfície das formas sanguíneas do parasito, as formas tripomastigotas, são encontradas várias proteínas apresentando sequencias altamente variáveis como, por exemplo, as proteínas de superfície associadas às mucinas, denominadas MASPs. Codificada por uma família multigênica que apresenta mais de 1000 cópias no genoma do clone CL Brener (El-Sayed, Myler, Bartholomeu*, et al.*, 2005), as MASPs são proteínas altamente polimórficas envolvidas na invasão celular e mecanismos de escape do sistema imune (Dos Santos *et al.*, 2012).

O *T. cruzi* apresenta, ainda, uma estrutura populacional altamente heterogênea caracterizada pela ocorrência de diferentes cepas apresentando grande variabilidade em

termos de virulência, infectividade, tropismo tecidual diferenciado (relacionado às diferentes manifestações clínicas da doença), progressão da doença e sensibilidade a drogas (Machado *et al.*, 2006). Um grande desafio, inclusive, para o tratamento da doença de Chagas está na ocorrência de poliparasitismo, já que comumente o indivíduo está infectado com cepas de *T. cruzi* apresentando características diferentes (Perez, Lymbery e Thompson, 2014). Além disso, também é observado que algumas cepas predominam em determinadas regiões geográficas. Em 2009 foi proposta uma classificação das cepas, clones e isolados de *T. cruzi* baseada em marcadores moleculares que permitiu dividir a população em 6 grupos ou D.T.Us (Zingales *et al.*, 2009). De acordo com esse consenso, as cepas e isolados de *T. cruzi* devem ser divididas em seis DTUs (*T. cruzi* I-VI), sendo as cepas classificadas como *T. cruzi* V e VI aquelas de caráter híbrido (Zingales *et al.*, 2009). Dentre as cepas híbridas, está o clone CL Brener usado como referência para o projeto genoma de *T. cruzi* (El-Sayed, Myler, Bartholomeu*, et al.*, 2005). Dentre os fatores que podem estar relacionados às diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas, encontra-se certamente a alta diversidade genética presente tanto na população humana afetada quanto na população do parasito (Bellini *et al.*, 2012; Henao-Martínez, Schwartz e Yang, 2012).

O *T. brucei*, por outro lado, não apresenta uma estrutura populacional tão variável. Sua distribuição está restrita à África sub-saariana e taxonomicamente a espécie pode ser dividida em três sub-espécies: *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense* e *T. b. brucei*. Os dois primeiros são parasitos humanos causadores da doença do sono enquanto o último está restrito a infecções de vertebrados não-humanos, causando uma doença em gado conhecida como "Nagana" e que tem um enorme impacto econômico para vários países africanos (Balmer *et al.*, 2011).

1.2- O genoma e a expressão gênica em tripanosomatídeos

No presente trabalho buscou-se investigar o envolvimento de proteínas de reparo de DNA na resposta ao estresse oxidativo em *T. cruzi* e *T. brucei* utilizando como ferramenta molecular o nocaute gênico. Esses estudos foram baseados no crescente entendimento da organização genômica e mecanismo de transcrição desses parasitos.

A publicação das sequências completas dos genomas do *T. cruzi* (El-Sayed, Myler, Bartholomeu*, et al.*, 2005), *T. brucei* (Berriman *et al.*, 2005) e *L. major* (Ivens *et al.*, 2005), também conhecidos como *Tri-Tryp genomes*, revelou várias características comuns aos três tripanosomatídeos (El-Sayed, Myler, Blandin*, et al.*, 2005), além de uma grande sintenia gênica (observada na **Figura 2A**). Os genes codificadores estão, de forma geral, organizados em longos clusters de dezenas a centenas de genes codificados em uma mesma fita de DNA (El-Sayed, Myler, Blandin*, et al.*, 2005; Daniels, Gull e Wickstead, 2010). O genoma do *T. cruzi*, de aproximadamente 60 Mb (o genoma haploide), contém cerca de 12.000 genes e apresenta como principal característica o fato de possuir uma grande porção (~50%) de sequências repetitivas que correspondem às grandes famílias de proteínas de superfície, retrotransposons e repetições subteloméricas (El-Sayed, Myler, Bartholomeu*, et al.*, 2005).

A expressão gênica em tripanosomatídeos apresenta várias peculiaridades em relação ao que é comumente observado em outros organismos eucariotos. Ao contrário da maioria dos eucariotos nos quais grande parte da regulação gênica ocorre no nível transcricional, em tripanosomatídeos a regulação ocorre especialmente ao nível pós-transcricional, podendo ser regulada nas etapas de processamento por *trans-splicing* e poliadelinação do pre-mRNA, tradução ou degradação do mRNA maduro (Clayton, 2014). A observação de que muitos genes, apesar de apresentarem transcrição constitutiva, têm

seus mRNAs diferencialmente expressos ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi* é uma forte evidência que indica a predominância da regulação pós-transcricional da expressão gênica em tripanossomatídeos (Minning *et al.*, 2009; Araújo e Teixeira, 2011). O acúmulo diferencial de um mRNA durante o desenvolvimento estágio específico é causado por mudanças na sua estabilidade e não pelo aumento ou diminuição da taxa de transcrição (Teixeira, Kirchhoff e Donelson, 1995; Coughlin *et al.*, 2000; Da Silva, Bartholomeu e Teixeira, 2006; Haanstra *et al.*, 2008; Clayton, 2014).

Enquanto que, para a maioria dos eucariontes, a RNA Polimerase II reconhece promotores específicos para cada gene e transcreve todos os genes codificadores de proteínas, em tripanosomatídeos não foram identificadas regiões com características de promotores para RNA Polimerase II em nenhum gene codificador de proteínas, apesar de terem sido identificados sítios de iniciação da transcrição no início dos clusters de genes (Teixeira e Darocha, 2003; Siegel *et al.*, 2011). Como consequência, os transcritos são formados por longas sequências de mRNA policistrônicos, nas quais os genes são separados por pequenas sequências intergênicas. Apesar de pertencerem a uma mesma unidade gênica transcricional, genes diferentes podem apresentar padrões de expressão diferentes graças aos vários mecanismos de controle pós-transcricional citados acima (Vanhamme e Pays, 1995; Donelson, Gardner e El-Sayed, 1999).

Na **Figura 2B** está representado o mecanismo de processamento do pré-mRNA por *trans-splicing* e poliadenilação. A clivagem do pré-mRNA policistrônico ocorre no núcleo para produzir os mRNAs monocistrônicos. As sequências intergênicas contêm motivos de polipirimidinas (pPy) que são necessárias para o processamento do transcrito primário. Durante o processamento são adicionados na porção 5' terminal uma sequência de 39 nucleotídeos chamada miniexon ou *spliced leader* (SL) contendo um resíduo de 7-metil guanosina (em inglês *cap*).

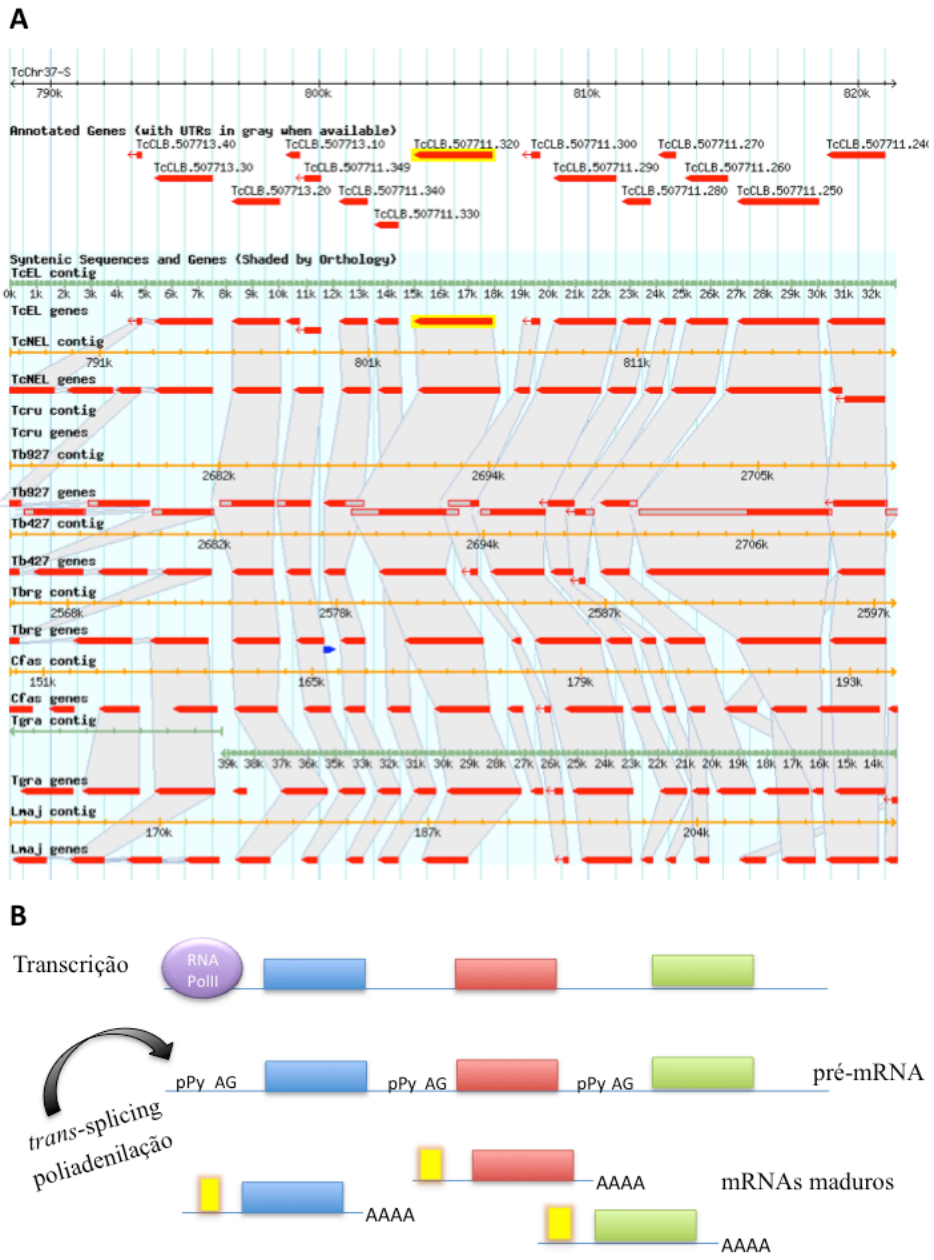


Figura 2: Organização do genoma e mecanismo de processamento pós-transcricional em tripanossomatídeos. A) A organização de genes que serão transcritos como uma unidade transcricional policistrônica em diferentes membros está representada pelos "contigs" gerados a partir das sequencias desses parasitos mostrados acima e que estão depositados no banco de dados Tritrypdb. Em destaque pelas bordas amarelas está o gene *msh2* de *T. cruzi*. Na parte inferior (colorido em cinza) é possível visualizar a grande sintenia gênica entre os diferentes tripanosomatídeos. Disponível em http://tritrypdb.org. **B)** Durante a transcrição policistrônica vários genes *in tandem* são transcritos como um pre-mRNA multigênico que é processado por *trans-splicing* e poliadenilação, adicionando um cap *spliced leader* (blocos amarelos) e geração mRNAs individuais, cada qual com cauda poli-A.

Na porção 3' terminal ocorre a adição de uma cauda poli (A) para cada mRNA. A adição do SL e a poliadenilação não são eventos independentes. Acredita-se que eles ocorram concomitantemente ou logo após a transcrição. A SL é adicionada ao mRNA por uma reação intermolecular de *trans*-esterificação chamada *trans- splicing*, no qual o RNA do SL funciona como espécie doadora e mRNA que está sendo sintetizado como espécie aceptora. O sítio de adição do SL é um dinucleotídeo AG conservado que se situa na região acima do motivo de polipirimidinas na região 5' intergênica. Já a seleção do poli(A) ocorre devido à posição do sítio de adição de SL do gene situado logo abaixo no transcrito primário policistrônico (Campbell, Thomas e Sturm, 2003; Teixeira e Darocha, 2003; Preußer, Jaé e Bindereif, 2012).

1.3- Manipulação gênica em tripanosomatídeos:

Dentre os mecanismos utilizados para estudar o papel de um gene estão a deleção gênica, super-expressão, silenciamento, complementação de mutantes, inserção de gene repórter e a determinação da localização sub-celular da proteína que este codifica por meio da fusão com sequências codificadoras de proteínas fluorescentes ou pequenos peptídeos usados como *tag*. O desenvolvimento de protocolos de transfecção foi fundamental para que a função de genes pudesse ser estudada em tripanosomatídeos, a partir de estratégias de manipulação gênica. Conforme descrito no item anterior, dentre os elementos necessários para o adequado processamento do mRNA primário, e que consequentemente um vetor de transfecção deve possuir, estão os sinais de adição de SL acima da região codificadora do gene exógeno para *trans- splicing* e sinais de poliadenilação inseridos abaixo da região codificadora. Apesar de, como já citado, não terem sido identificadas no genoma sequências promotoras reconhecidas pela RNA polimerase II, sequências contendo o promotor de rRNA, reconhecido pela RNA polimerase I são capazes de

aumentar enormemente a eficiência de transcrição de um gene exógeno em *T. cruzi* (Teixeira e Darocha, 2003).

Em 2004 DaRocha e colaboradores avaliaram o papel de diferentes regiões 5' não traduzidas (UTRs) e regiões intergênicas (IRs), contendo sítios de adição para SL, na expressão do gene repórter de luciferase. Quando colocados após a seqüência promotora de rRNA, seqüências derivadas da 5' UTR mais IR de GAPDH, TcP2β (HX1) e α- e β-tubulina aumentam consideravelmente o nível de expressão de luciferase em epimastigotas. Entretanto as regiões regulatórias correspondentes do gene de amastina diminuíram a expressão do repórter (Darocha, Silva*, et al.*, 2004). Em trabalho similar, Nozaki e Cross (1995) e Araújo e colaboradores (2011) avaliaram o efeito das regiões 3' UTR e IR de vários genes estágio – específicos e constitutivos de *T. cruzi* na expressão do gene repórter luciferase de vaga – lume. Dentre as regiões estudadas estão as 3' UTRs dos genes glicoproteína 72 (*gp*72), glicoproteína 85 (*gp* 85), gliceraldeído 1-fosfato desidrogenase (*gapdh*), tubulina e amastina (*ama*) (Nozaki e Cross, 1995; Araújo *et al.*, 2011).

Para a introdução de DNA exógeno em uma célula são realizados procedimentos de transfecção. Essa pode ser transiente, pois o vetor de transfecção permanece na forma episomal, não integrada no genoma, o que permite análises em até 48 horas. No caso de transfecções permanentes, as células transformadas são selecionadas por apresentarem um plasmídeo que se integra no genoma e contém um marcador de seleção, por exemplo, um gene de resistência a droga. Para que o plasmídeo seja inserido no genoma, tornando a transfecção permanente, é necessário que este possua uma sequência idêntica à região alvo para a integração. O plasmídeo é linearizado com uma enzima de restrição e a inserção se dá por recombinação homóloga entre as sequências do plasmídeo e a sequência alvo no genoma. No caso de uma deleção gênica, as regiões 5' e 3' UTR de um gene de interesse

são inseridas em um vetor, flanqueando um marcador de seleção. Se o gene não for essencial haverá deleção por recombinação homóloga, inicialmente do primeiro alelo e, em uma segunda etapa de transfecção, do segundo alelo do gene (Clayton, 1999).

Apesar de ser amplamente utilizado para silenciamento gênico em *T. brucei* (Alibu *et al*., 2005), o silenciamento por interferência de RNA (RNAi) não pode ser utilizado para a diminuição da expressão gênica em *T. cruzi*. Quando avaliado o nível de expressão de amastina, após transfecção com o RNA dupla-fita (dsRNA) de amastina, este não foi processado gerando os pequenos RNAs de interferência de 21 nt (siRNAs) e o nível do mRNA de amastina permaneceu inalterado (Darocha, Otsu*, et al.*, 2004). A publicação da sequência do genoma mostrou que *T. cruzi* (El-Sayed, Myler, Bartholomeu*, et al.*, 2005) e *L. major* (Ivens *et al.*, 2005) não possuem os componentes da maquinaria de RNAi. Entretanto, *T. brucei* apresenta o gene de *Ago*1, bem como o ortólogo da Dicer (Shi, Tschudi e Ullu, 2006a; b). A maquinaria de RNAi pode ser utilizada no silenciamento gênico em *T. brucei* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*, mas não em *T. cruzi* (Alibu *et al.*, 2005; Lye *et al.*, 2010; Kolev, Tschudi e Ullu, 2011).

Recentemente foi descrito por Peng e colaboradores o uso do sistema CRISPR-Cas9 na manipulação não somente de genes de cópia única, mas também de famílias multigênicas. Esse sistema consiste em editar um alvo no genoma utilizando um RNA guia que dirige a nuclease Cas9 para determinada localização no genoma por meio da hibridização do RNA guia-DNA alvo, introduzindo uma quebra dupla no DNA e favorecendo a recombinação homóloga (Peng *et al.*, 2014).

Os protocolos de transfecção e manipulação de genes em *T. cruzi* permitiram, portanto, o desenvolvimento de inúmeros estudos investigando vias metabólicas que são essenciais para o conhecimento de aspectos importantes da biologia desse parasito. Dentre

essas vias metabólicas, estão as vias de reparo de DNA, cujos estudos em *T. cruzi* foram iniciados pelo nosso grupo em 2001, e que são o foco desse trabalho de Tese.

1.4- Sistemas de reparo de DNA em tripanosomatídeos e o papel do MMR na geração de variabilidade genética no *T. cruzi.*

Em qualquer organismo, o balanço entre as taxas de mutação e de reparo leva ao equilíbrio entre instabilidade e estabilidade genômica e à consequente evolução adaptativa dos organismos (Elena e Lenski, 2003). A manutenção da estabilidade genômica é uma consequência direta dos mecanismos que asseguram a fidelidade da replicação e da eficiência dos sistemas de reparo do DNA, tais como o BER (Reparo de Excisão de Base), NER (Reparo de Excisão de Nucleotídeo) e MMR (Reparo de Erros de Pareamento). Por apresentarem papel decisivo na manutenção genômica, os sistemas de reparo podem contribuir para a geração de diversidade genética de uma espécie (Machado *et al.*, 2006; Li, 2008).

O MMR é a via encontrada em procariotos e eucariotos para correção de erros de pareamento de bases e alças de inserção/deleção (IDLs) gerados durante a replicação e recombinação do DNA. Como ilustrado na **Figura 3**, em procariotos a via é iniciada pelas proteínas MutS, MutL (ambas ATPases) e MutH (uma endonuclease metil-dependente), que apresentam atividade específica para determinadas sequências (Junop *et al.*, 2003). O reconhecimento do erro se dá por meio de um dímero formado pelas proteínas MutS, que escaneiam o DNA em busca de erros gerados após a replicação. Em seguida, o dímero MutL interage fisicamente com MutS e recruta MutH. A proteína MutH ativada pelo dímero MutL será capaz de reconhecer a fita recém sintetizada devido à presença de sequências GATC não metiladas e dará origem à excisão da base erroneamente pareada

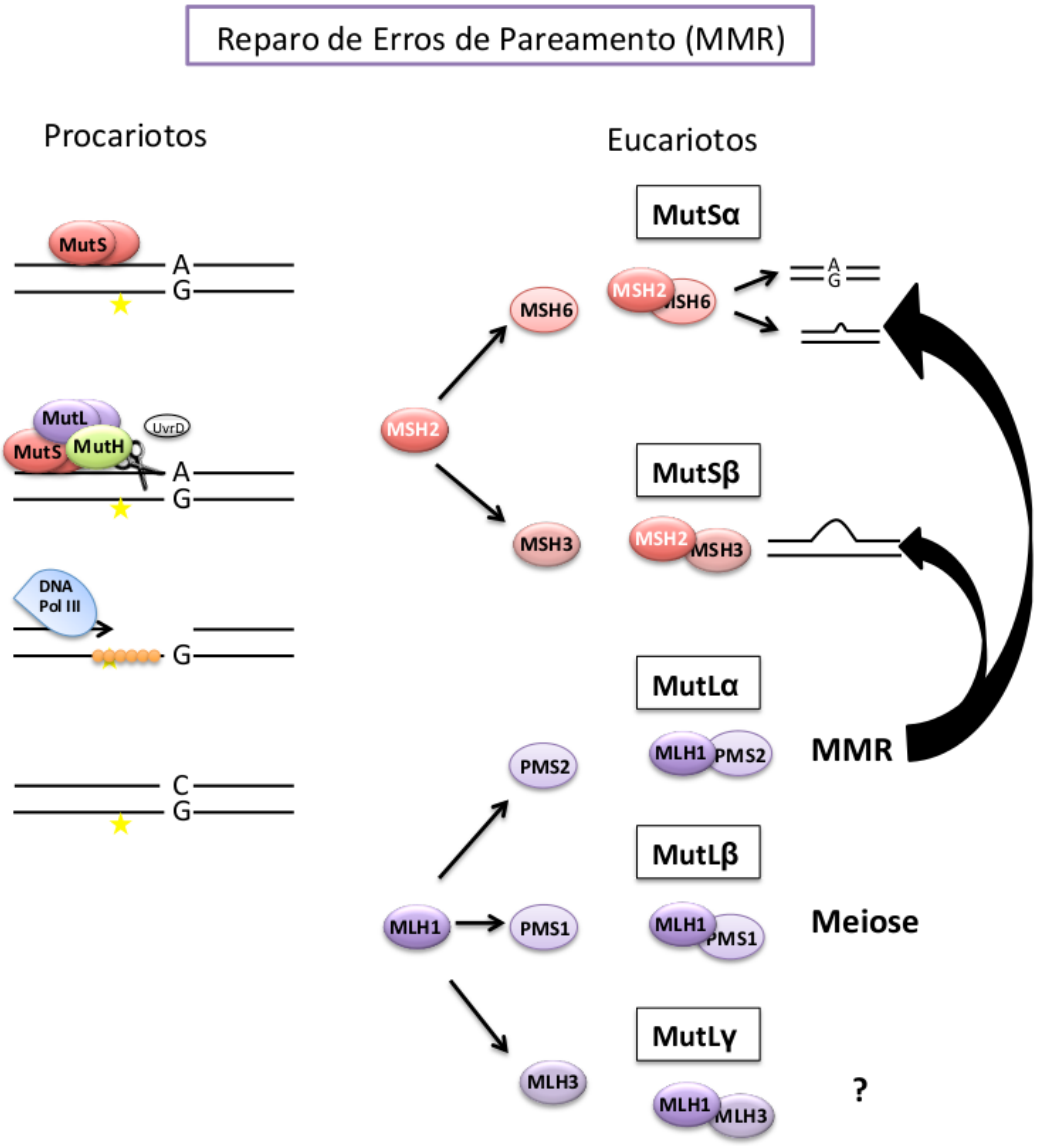


Figura 3: O Sistema de Reparo de Erros de Pareamento em procariotos e eucariotos. Em procariotos, o homodímero MutS se liga ao erro de pareamento e recruta o homodímero MutL, que ativa a endonuclease MutH. A proteína MutH corta a fita não metilada que contém a base incorreta. Este fragmento é clivado e degradado. O DNA é então re-sintetizado e ligado. Em eucariotos, a proteína MutH não é encontrada e as proteínas MSH (homóloga a MutS) e MLH (homóloga a MutL) interagem formando heterocomplexos que reparam tanto erros de pareamento quanto alças de inserção/deleção (IDLs).

por meio de um corte na fita não metilada. Juntamente com a ação de outras proteínas como a UvrD (helicase II) e a SSB (*Single-Stranded DNA Binding protein*) a base incorreta será removida e, através da ação da DNA polimerase III a base correta será inserida e o corte selado pela DNA Ligase (Goliasnaia e Tsvetkova, 2006).

Eucariotos codificam várias proteínas homólogas às proteínas encontradas no MMR de procariotos, incluindo proteínas que não estão envolvidas no MMR. Os homólogos para a proteína MutS são denominados *MutS homologs* ou MSH e numerados de acordo com a ordem em que foram descobertos. A proteína MSH2 faz parte de todos os heterodímeros que podem ser formados para o reconhecimento do erro e é necessária para a correção de erros de pareamento e alças de inserção/ deleção no DNA nuclear. Deste modo, o heterodímero formado por MSH2 e MSH6, também chamado MutSα, atua no erro de pareamento base-base e em pequenas alças de inserção/deleção (IDLs), enquanto o heterodímero formado por MSH2 e MSH3, chamado MutSβ, atua principalmente no reparo de alças de inserção/deleção (IDLs) maiores. Já a proteína MutL possui quatro homólogos: MLH1, MLH3, PMS1 e PMS2, de modo que os heterodímeros formados são: MutLα (MLH1/PMS2), MutLβ (MLH1/PMS1) e MutLγ (MLH1/MLH3). O MutLα é necessário para o MMR, enquanto o MutLγ apresenta papel durante a meiose. Porém, não se sabe a função biológica do MutLβ. Em eucariotos, não são encontrados homólogos para MutH e UvrD (Li, 2008).

Após o reconhecimento do erro de pareamento, ocorre uma mudança conformacional dependente de ATP dos heterodímeros MSH2-6 ou MSH2-3 o que promove a interação com os homólogos de MutL no local da lesão. O PCNA, componente da maquinaria de replicação, ativa heterodímeros MutL dando início à excisão da fita filha e permitindo a remoção de uma sequência de oligonucleotídeos na fita que contém o erro de pareamento (Erie e Weninger, 2014). Em algumas bactérias a excisão é catalisada por

MutH, entretanto essa proteína não é encontrada em todas bactérias e homólogos não foram descritos para nenhum eucarioto. Nesse caso, a etapa de excisão é catalisada pela atividade de endonuclease relacionada ao heterodímero MutL formado por MLH1-PMS1 (Kadyrov *et al.*, 2006). Na ausência de MutH que cliva a fita de DNA não metilada nos sítios GATC em células bacterianas, um corte pré-existente na fita é suficiente para ativar a maquinaria de MMR em células eucarióticas (Pillon, Miller e Guarné, 2011).

Defeitos na via de MMR estão relacionados a um aumento nas taxas de mutação em todos os organismos, incluindo *T. brucei* (Bell *et al.*, 2004). O MMR leva a um aumento de ~100 vezes na fidelidade de replicação do DNA por prevenir substituição de bases ou instabilidade de sequências repetitivas que surgem de erros, intermediários na replicação do DNA ou recombinação homóloga (Iyama e Wilson, 2013). Por atuar principalmente no reparo pós-replicação, corrigindo os erros que escapam da atividade revisora da DNA Polimerase, mutações em proteínas do MMR que levem a um MMR defectivo aumentam a taxa de mutação. O que tem sido correlacionado a diferentes fenótipos, como a predisposição a cânceres em células humanas: câncer de cólon hereditário e uma variedade de cânceres esporádicos. Além disso, outros papéis estão relacionados às proteínas do MMR, como: atividade anti-recombinante entre sequências divergentes; tolerância a danos no DNA; apoptose; recombinação meiótica e mitótica; mudança de classe e hipermutação somática em imunoglobulinas e expansão de repetição de trinucleotídeo (Jiricny, 2006; Li, 2008).

Com o sequenciamento do genoma completo do *T. cruzi* e *T. brucei* foi possível identificar ortólogos de genes que codificam MutS e MutL. No genoma do *T. cruzi* foram encontradas sequencias codificadoras de MSH2, MSH3, MSH4, MSH5 e MSH6. Em relação aos ortólogos de MutL, foram identificados MLH1 e PMS1, enquanto PMS2, MLH2 e MLH3 estão ausentes (El-Sayed, Myler, Bartholomeu*, et al.*, 2005; Passos-Silva

et al., 2010). Não foi encontrada nenhuma sequencia homóloga a MSH1, a qual, em *Saccharomyces cerevisiae*, está envolvida ano reparo do DNA mitocôndrial, incluindo reparo de danos oxidativo (Reenan e Kolodner, 1992; Kaniak *et al.*, 2009; Pogorzala, Mookerjee e Sia, 2009). Em conjunto com o BER, MSH1 atua na prevenção de mutações induzidas por lesões oxidativas (Pogorzala, Mookerjee e Sia, 2009). Apesar de não estar envolvido na recombinação homóloga durante a meiose (Sia e Kirkpatrick, 2005), acredita-se que MSH1 em *S. cerevisiae* atue na recombinação homólogas de quebras duplas no DNA que podem advir de danos oxidativos e que se não reparadas podem levar a rearranjos do DNA mitocondrial (Kaniak *et al.*, 2009).

As proteínas envolvidas no MMR em *T. brucei* foram inicialmente descritas por Bell e colaboradores (Bell *et al.*, 2004). Foram identificados os genes de *Tbmsh2*, *Tbmsh3*, *Tbmsh8*, *Tbmlh1* e *Tbpms1* presentes como cópia única no genoma. A proteína MSH6 em *T. brucei* encontra-se truncada no N-terminal. Por esse motivo foi inicialmente denominada MSH8, porém análises de resíduos conservados e filogenéticas mostram que a proteína denominada MSH8 é bem próxima do MSH6 eucariótico, passando então a ser denominada TbMSH6. Com o sequenciamento completo do genoma do *T. brucei*, foram confirmadas as presenças de todos os genes codificadores desses vários componentes do MMR, além de MSH4 e MSH5 (Berriman *et al.*, 2005).

A geração de parasitos *T. brucei* na forma sanguínea nocautes para MSH2 e MLH1 revelou que esses parasitos são mais tolerantes aos danos gerados pela exposição ao agente metilante MNNG (*N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine*), além de instabilidade de microssatélites (Bell *et al.*, 2004). A via de MMR está relacionada à resposta a danos causados no DNA após tratamentos com drogas genotóxicas. Agentes alquilantes como o MNNG metilam guaninas dando origem à O^6-metilguanina (O^6-MeG). A O^6-MeG pode ser removida por uma metiltransferase. Caso não seja removida, pode levar ao pareamento

incorreto da guanina com uma timina o qual pode ser reparado pela maquinaria do MMR (Schofield e Hsieh, 2003). Células que apresentam deficiência no MMR são mais tolerantes aos danos gerados por agentes alquilantes (De Wind *et al.*, 1995). Ciclos fúteis de reparo na tentativa de eliminar o dano levam à sinalização celular para apoptose em células MMR-proficientes. Entretanto, em células com o MMR defectivo, devido à perda de proteínas do MMR sinalizando para a morte celular, as células se tornam mais resistentes ao MNNG (Noonan *et al.*, 2012). Outro indicador da eficiência com que uma célula é capaz de reparar seus erros de pareamento, e consequentemente uma medida da eficiência do MMR, é a estabilidade de sequencias repetitivas simples, como os microsatélites. Na presença de sequencias repetitivas, a DNA Polimerase frequentemente incorpora nucleotídeos a mais ou então deixa de incorporar alguns nucleotídeos. Esses erros geram alças contendo uma ou mais repetições. O reparo dessas lesões ocorre pela via de MMR; porém, mutações em proteínas da via levam a um reconhecimento e reparo ineficiente dessas pequenas alças. A desestabilização dos microsatélites é chamada instabilidade de microssatélites (Sia *et al.*, 2001). Os dados de tolerância ao MNNG e instabilidade de microssatélites sugerem, portanto, que parasitos *Tbmsh2* e *Tbmlh1* nocautes apresentam um MMR defectivo (Bell *et al.*, 2004). Entretanto, apesar dos nocautes supracitados do MMR na forma sanguínea de *T. brucei* mostrarem um aumento da frequência de recombinação, essa via não está relacionada à regulação da mudança de glicoproteínas de superfície (VSG) (Bell e Mcculloch, 2003).

Devido ao seu papel central na via de MMR, a caracterização dessa via em *T. cruzi* foi iniciada pelo gene *Tcmsh2*. Estudos iniciados pelo nosso grupo em 2001, antes do sequenciamento completo do genoma do clone CL Brener, mostraram que esse gene, que está presente no genoma do *T. cruzi* com uma única cópia, codifica uma proteína de 962 aminoácidos expressa em todas as fases do ciclo de vida do parasito (Augusto-Pinto *et al.*,

2001). Análise das sequências de *Tcmsh2* de diversas cepas permitiu a identificação de sítios de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), que levam a uma alteração na sequência de aminoácidos da proteína. Dessa forma, as proteínas que apresentam cada uma das substituições de aminoácidos foram denominadas isoformas TcMSH2a, TcMSH2b e TcMSH2c e os parasitos que possuem cada uma das isoformas classificados em três haplogrupos distintos chamados A, B e C (Augusto-Pinto *et al.*, 2003). A divisão em haplogrupos A, B e C utilizando MSH2 como marcador molecular corrobora com a mais recente divisão das cepas em DTUs I-VI (Zingales *et al.*, 2009). Cepas pertencentes aos haplogrupos A e C estão correlacionadas às linhagens *T. cruzi* I e II, enquanto o haplogrupo B é formado por cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* III (Augusto-Pinto *et al.*, 2003; De Freitas *et al.*, 2006; Zingales *et al.*, 2009).

Algumas evidências, dentre elas análises de instabilidade de microsatélites em culturas crescidas na presença de H_2O_2 e de testes de resistência à cisplatina, sugerem que cepas pertencentes aos diferentes haplogrupos de MSH2 podem apresentar variação quanto à eficiência do MMR (Augusto-Pinto *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2011). Estudos revelam que, em vários organismos, um MMR menos eficiente pode levar a uma maior taxa de mutação, com consequente aumento da diversidade genética da população (Schofield e Hsieh, 2003; Iyer *et al.*, 2006). No caso de *T. cruzi*, pode-se especular que cepas que apresentam maior diversidade genética teriam maior sucesso para conquistar o ciclo doméstico e infectar o homem, uma vez que teriam mais recursos do ponto de vista genético para escapar à ação do sistema imune. Por outro lado, um MMR mais eficiente levaria a uma menor taxa de mutação, com consequente diminuição da diversidade genética (Machado *et al.*, 2006). Foi observado que as cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* I estão associadas ao ciclo silvestre do parasito, enquanto as cepas pertencentes ao grupo II geralmente estão associadas ao ciclo doméstico da doença, sendo mais

frequentemente encontradas em amostras isoladas de pacientes com a doença de Chagas (Zingales *et al.*, 1998; De Freitas *et al.*, 2006). Assim, de acordo com os dados de Augusto-Pinto *et al.* (2003) e de Campos *et al*. (2011), foi formulada a hipótese de que cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* II e caracterizadas como pertencentes ao haplogrupo MSH2- C apresentariam um MMR menos eficiente, o que teria resultado em uma maior variabilidade genética desse grupo. Por outro lado, cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* I, com parasitos apresentando MSH2 característico do haplogrupo A, teriam MMR mais eficiente e, portanto, menor variabilidade genética (Machado *et al.*, 2006). Dados de sequências de famílias multigênicas corroboram essa hipótese, pois revelaram que cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* II e cepas híbridas apresentam uma maior variabilidade nas sequências analisadas quando comparadas a sequências ortólogas de cepas da linhagem *T. cruzi* I (Cerqueira *et al.*, 2008). Dados mais recentes, no entanto, mostraram a existência de uma grande variabilidade também entre as cepas da linhagem *T. cruzi* I (Ramírez *et al.*, 2012).

1.5- O papel do MMR na resposta ao estresse oxidativo em tripanosomatídeos

Além do seu papel no MMR e possível relação com a diversidade genética em *T. cruzi*, os dados obtidos pelo nosso grupo e pelo grupo do Dr. Richard McCulloch (Universidade de Glasgow) sugeriram o envolvimento das proteínas TcMSH2 e TbMSH2 também na resposta aos danos oxidativos sofridos pelas células. Embora, na maioria das células, o NER e o BER sejam as vias responsáveis por reparar as lesões no DNA induzidas por ROS, o MMR também tem papel fundamental na prevenção de mutações associadas a lesões oxidativas no DNA (Brierley e Martin, 2013). Em outros tipos

celulares já foi observado o envolvimento de proteínas do MMR na remoção de lesões oxidativas no DNA, dentre elas a 8-oxoguanina (8-oxoG) resultado de uma oxidação da guanina na posição 8 (Ni, Marsischky e Kolodner, 1999; Wyrzykowski e Volkert, 2003; Zlatanou *et al.*, 2011). Em fibroblasto humano foi observado a participação das proteínas do MMR MSH2 e MSH6 na resposta ao estresse oxidativo utilizando uma via de reparo que seria independente do MMR. O complexo formado por essas proteínas está relacionado com a mono-ubiquitinação do PCNA na resposta a lesões oxidativas no DNA. De acordo com essa hipótese, em condições de estresse oxidativo podem ser formados clusteres de DNA danificado que seriam refratários à ação da DNA glicosilase. Esse tipo de lesão é, então, reconhecido por MSH2-MSH6 os quais recrutam uma exonuclease, provavelmente Exo1. O PCNA pode então se ligar ao fragmento de DNA contendo as lesões em tandem ou pode interagir diretamente com MSH2-MSH6, uma vez que MSH6 possui motivo de ligação ao PCNA. MSH2-MSH6 é indispensável para a monoubiquitinação do PCNA e o PCNA monoubiquitinado irá formar um complexo com Polη, a qual provavelmente está associada à síntese do DNA nas etapas finais do reparo (Zlatanou *et al.*, 2011).

Em 2008 o nosso grupo descreveu que formas sanguíneas de *T. brucei* (Machado-Silva *et al.*, 2008) que tiveram os dois alelos do gene *msh2* deletados são mais sensíveis ao tratamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) do que parasitos selvagens, sugerindo, pela primeira vez, que a proteína MSH2 estivesse envolvida na resposta ao estresse oxidativo nesse parasito. Esse fenótipo foi revertido com a expressão de *msh2* de *T. cruzi* ou a re-expressão do gene de *T. brucei* nos mutantes. Porém, análises de instabilidade de microsatélites e de resistência a MNNG mostraram que a expressão do gene *msh2* de *T. cruzi* nos nocautes de *msh2* em *T. brucei* não foi capaz de complementar o reparo de danos no DNA causados pelo MNNG e nem reverter a instabilidade de microssatélites, ou seja,

não foi capaz de complementar a funcionalidade da via do MMR. Por outro lado, a deleção do gene que codifica MLH1 em *T. brucei* não afeta a sensibilidade das células a H_2O_2, sugerindo que o papel do MSH2 na resposta ao dano oxidativo ocorre de maneira independente dos outros componentes do MMR (Machado-Silva *et al.*, 2008).

Como citado anteriormente, cepas *T. cruzi* I são mais tolerantes ao tratamento com H_2O_2 e apresentam um menor acúmulo de 8-oxoguanina, após exposição a H_2O_2, em seu genoma quando comparadas às cepas pertencentes ao grupo *T. cruzi* II (Campos *et al.*, 2011). Para investigar o papel do MMR nessa resposta ao estresse oxidativo o nosso grupo optou pela estratégia de deletar o gene codificador da principal proteína da via de MMR: TcMSH2. De maneira inesperada, observamos que, apesar da deleção de um dos alelos do gene *Tcmsh2* poder ser obtida com certa facilidade, não era possível gerar parasitos com os dois alelos de *msh2* deletados. As linhagens *Tcmsh2* heminocautes (ou seja, que tiveram somente um alelo de *msh2* deletado) se mostraram mais sensíveis ao tratamento com H_2O_2, além de acumularem maiores níveis de 8-oxoguanina no kDNA (Campos *et al.*, 2011).

Esses dados, juntamente com estudos de complementação de linhagens duplo nocaute para *msh2* em *T. brucei* com o gene *msh2* de *T. cruzi* – capaz de reverter o fenótipo de sensibilidade ao H_2O_2, mas não o MMR (Machado-Silva *et al.*, 2008) – sugerem que a proteína MSH2 apresenta um papel adicional, MMR-independente, na resposta ao estresse oxidativo e na manutenção da estabilidade do genoma em tripanossomatídeos.

1.6- Proteínas envolvidas na resposta anti-oxidante em Tripanosomatídeos:

Durante a diferenciação de formas epimastigotas de *T. cruzi* para formas tripomastigotas metacíclicas ocorre um aumento de expressão de enzimas envolvidas no metabolismo anti-oxidante. Essas alterações provavelmente representam uma pré-adaptação das formas tripomastigotas metacíclicas para enfrentarem o estresse oxidativo do hospedeiro vertebrado durante a infecção (Atwood *et al.*, 2005). Para que a infecção seja bem sucedida os parasitos precisam lidar com o estresse oxidativo produzido pelo hospedeiro e também aquele gerado pelo seu próprio metabolismo (Piacenza, Alvarez*, et al.*, 2009). Sendo a mitocôndria, única em tripanosomatídeos, a maior fonte geradora de ROS intracelular, inclusive em condições fisiológicas (Menna-Barreto e De Castro, 2014). Várias enzimas com diferentes especificidades de substrato e localização sub-celular estão envolvidas na ação anti-oxidante no parasito. Dentre as enzimas super-expressas na diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas estão a ascorbato peroxidase (TcAPX), triparedoxina peroxidase (TcMPX e TcCPX), triparedoxina (TPX), tripanotiona sintase (TcTS) e superóxido dismutase contendo ferro (Fe-TcSOD) (Atwood *et al.*, 2005; Piacenza, Zago*, et al.*, 2009). Além disso, as peroxiredoxinas têm sua expressão aumentada em formas metacíclicas infectante de isolados virulentos quando comparados a cepas atenuadas (Piacenza, Zago*, et al.*, 2009). As triparedoxinas peroxidases e as superóxido dismutases apresentam expressão variável ao longo da curva de crescimento de formas epimastigotas, sendo essa expressão diferente para diferentes cepas do parasito. Essa expressão diferenciada está relacionada com a liberação de ROS, sugerindo que ROS atua como molécula sinalizadora do estado redox ao longo do ciclo de vida (Peloso *et al.*, 2012). A **Figura 4** mostra uma representação esquemática do metabolismo anti-oxidante de tripanosomatídeos, com as principais enzimas envolvidas, bem como enzimas que estão presentes em outros organismos mas ausentes em tripanosomas.

A enzima superóxido dismutase contando ferro (Fe-SOD) catalisa a conversão de ânion superóxido ($O_2^{\bullet}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Células de mamíferos apresentam isoformas da superóxido dismutase contendo cobre (Cu-SOD), manganês (Mn-

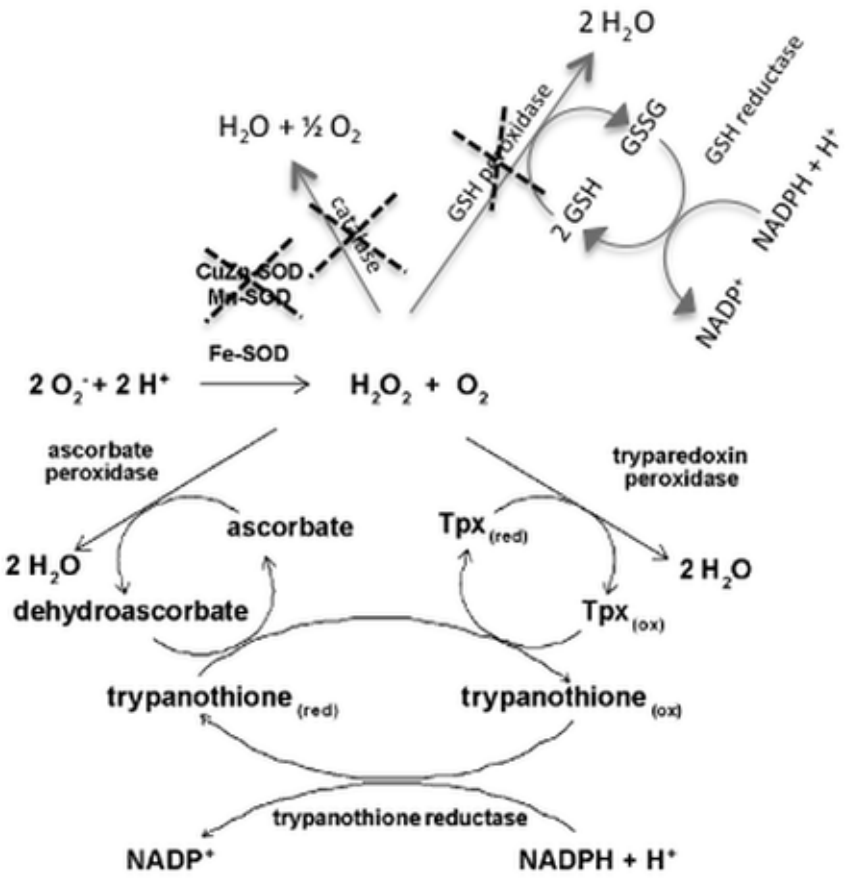


Figura 4: Metabolismo anti-oxidativo em tripanosomatídeos. Tripanosomas não possuem algumas enzimas importantes para eliminar peróxido, como catalase e glutationa peroxidase. Entretanto, apresenta um mecanismo eficiente na eliminação de ROS baseado na ação das enzimas ascobato peroxidase, tryparedoxina peroxidase e trypanotiona redutase. (Modificado de (Turrens, 2004).

SOD) e zinco (Zn-SOD) que não são encontradas em tripanosomas (Turrens, 2004). Os tripanosomatídeos codificam quatro isoformas de Fe-SOD, denominadas Fe-SODA, Fe-SODB1, Fe-SODB2 e Fe-SODC. Estudos de localização subcelular mostram que Fe-SODA e Fe-SODC localizam-se na mitocôndria, enquanto Fe-SODB1 e Fe-SODB2 estão, respectivamente, localizados no citoplasma e glicossomo (Dufernez *et al.*, 2006; Nogueira *et al.*, 2006). Parasitos *T. cruzi* super-expressando Fe-SOD são mais sensíveis aos danos causados por benzonidazol (Temperton *et al.*, 1998). Além disso, cepas e clones de *T. cruzi* resistentes a benzonidazol apresentam amplificação do gene TcSOD-A, aumento nos níveis do mRNA, da expressão da proteína e na atividade de TcSOD (Nogueira *et al.*, 2006).

Curiosamente esses parasitos não possuem catalase, a qual catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio para oxigênio e água, ou glutationa peroxidase, envolvida na redução de H_2O_2 com consequente oxidação de uma glutationa reduzida. Entretanto, expressam duas enzimas envolvidas no metabolismo de H_2O_2: ascorbato peroxidase e triparedoxina peroxidase. Embora não expressem glutationa peroxidase dependente de selênio (que catalisa a reação de H_2O_2 com consequente oxidação de uma glutationa reduzida), tripanosomas possuem duas formas de glutationa peroxidase: expressa em duas isoformas TcGPXI e TcGPXII, localizadas no citosol e glicosomo (TcGPXI) e retículo endoplasmático (TcGPXII); Essas enzimas não têm a capacidade de metabolizar H_2O_2, entretanto, ambas são capazes de metabolizar ácidos graxos e hidroperóxido derivados de fosfolipídeos. A redução de hidroperóxido se dá às custas de uma glutationa reduzida como doador de elétrons, mas não de uma tripanotiona (Wilkinson, Meyer*, et al.*, 2002). Em *T. brucei* são expressas três formas de glutationa peroxidase denominadas Px I, Px II e Px III. Sendo Px I e Px II formas citosólica e Px III mitocondrial. Na ausência de Px III os parasitos mostram uma leve e transiente diminuição na proliferação celular, enquanto a

ausência de Px I e Px II resulta em desintegração do lisossomo, seguida por danos na mitocôndria e de outras membranas celulares e lise celular total. Sugerindo que as formas Px I e Px II estão relacionadas com a proteção de membranas da peroxidação (Hiller *et al.*, 2014).

T. cruzi expressa duas enzimas da família das peroxiredoxinas que tem a capacidade de detoxificar H_2O_2, peroxinitrito e hidroperóxido de cadeia curta, são elas a TcCPX (triparedoxina peroxidase citosólica) e TcMPX (triparedoxina peroxidase mitocondrial) (Wilkinson *et al.*, 2000). As triparedoxinas são oxidoredutases que transferem equivalentes redutores da tripanotiona para várias proteínas thiol. Todos os tripanosomatídeos sintetizam triparedoxina, um dithiol derivado da glutationa, formado por duas moléculas de glutationa conjugadas com uma molécula de espermidina. As triparedoxinas são mantidas no seu estado reduzido pela tripanotiona redutase (TR) com o gasto de uma molécula de NADH e atuam transferindo equivalentes redutores da tripanotiona ($T[SH]_2$) para as vias de oxido-redução envolvendo mudanças thiol/disulfito (Turrens, 2004; Arias *et al.*, 2013). A super-expressão de TcCPX e TcMPX em formas epimastigotas de *T. cruzi* aumenta a proteção a peroxinitrito e esse efeito protetor é perdido quando o resíduo de cisteína no sítio catalítico é mutado (Piacenza *et al.*, 2008), além de conferir maior resistência ao tratamento com H_2O_2 (Peloso *et al.*, 2011). Formas tripomastigotas de *T. cruzi* expressam mais TcMPX e TcCPX do que as formas epimastigotas. Quando essas formas são tratadas com baixas concentrações de H_2O_2 a expressão dessas enzimas aumenta, entretanto ocorre uma diminuição na expressão quando as células são expostas a concentrações maiores de H_2O_2 (Gadelha *et al.*, 2013).

Localizada no retículo endoplasmático, a peroxidase dependente de ascorbato (TcAPX) está envolvida na redução de H_2O_2 a H_2O usando dihidrotripanotiona ($T[SH]_2$) como doador de elétrons na presença de ascorbato. Parasitos super-expressando TcAPX

são mais resistentes a H_2O_2 (Wilkinson, Obado*, et al.*, 2002). Populações de *T. cruzi* resistentes a benzonidazol expressam maiores níveis de TcAPX. Além disso, essas populações são mais resistentes ao tratamento com concentrações crescentes de H_2O_2 acompanhado de um aumento na expressão de TcAPX (Nogueira *et al.*, 2012).

Como descrito anteriormente, a tripanotiona ($T[SH]_2$) é um ditiol de baixo peso molecular que reduz as triparedoxinas (TXNs). O sistema $T(SH)_2$/TXN atua como carreador de elétrons para a detoxificação de hidroperóxidos e redução de ribonucleotídeos, peroxinitrito e sulfóxido de metionina. A tripanotiona ($T[SH]_2$) é encontrada exclusivamente em tripanosomatídeos. Por esse motivo, vários trabalhos têm buscado drogas que possam atuar no metabolismo da tripanotiona ($T[SH]_2$) como alvo terapêutico (Flohé, 2012; Bernardes, Zani e Carvalho, 2013; Kumar, Ali e Bawa, 2014; Maya *et al.*, 2014; González-Chávez *et al.*, 2015).

Um estudo recente revelou novas evidências que ressaltam a importância das enzimas envolvidas no metabolismo anti-oxidante em tripanosomas para a sobrevivência desses parasitos em seus hospedeiros. O *Trypanosoma rangeli*, assim como o *T. cruzi*, também é capaz de infectar os seres humanos, mas não causa doença ao seu hospedeiro, sendo, portanto, avirulento. Esta espécie compartilha com *T. cruzi* as mesmas regiões geográficas e os mesmos hospedeiros, mas diferente do *T. cruzi*, o *T. rangeli* não é capaz de se multiplicar no interior das células do hospedeiro mamífero (Grisard *et al.*, 1999). Quando cultivados na presença de diferentes concentrações de H_2O_2, o *T. rangeli* mostra-se mais susceptível aos danos causados pelo H_2O_2 do que *T. cruzi* (Stoco *et al*., 2014). As análises da sequência completa do genoma de *T. rangeli* obtida recentemente permitiram a busca das sequências codificadoras de enzimas envolvidas no metabolismo anti-oxidante do parasito. Como descrito por Stoco e cols. (2014) estão presentes as enzimas GPXI, GPXII, Fe-SODA, MPX, CPX, FeSODB, TS e TR; porém o ortólogo dos gene que

codifica a ascorbato peroxidase (APX) está presente como pseudogene, uma vez que apresenta códon de parada prematuro e alterações na fase de leitura. Como descrito anteriormente, a APX possui um papel importante na metabolização de H_2O_2 em *T. cruzi* (Nogueira *et al*., 2012). A ausência de APX em *T. rangeli* poderia ser um dos fatores que contribuem para a maior susceptibilidade desses parasitos ao H_2O_2 quando comparados ao *T. cruzi* e ainda poderia explicar os motivos pelos quais o *T. rangeli* é incapaz de sobreviver no interior das células dos mamíferos infectados (Stoco *et al.*, 2014).

Com o objetivo de entender o envolvimento de proteínas da via de reparo de erros de pareamento (MMR) na resposta a danos oxidativos no DNA dos tripanosomatídeos *T. cruzi* e *T. brucei*, o presente trabalho buscou caracterizar a principal proteína da via, a proteína MSH2, por meio da geração e análise dos fenótipos de linhagens de parasitos nocautes para esse gene em *T. cruzi* e *T. brucei*. Os estudos envolvendo *T. brucei* foram realizados na Universidade de Glasgow durante o estágio de Doutorado Sanduíche, sob a supervisão do Dr. Richard McCulloch.

2. Objetivos

2.1- Objetivo Geral

Avaliar o envolvimento de proteínas do Sistema de Reparo de Erros de Pareamento (MMR) na resposta a danos no DNA dos tripanosomatídeos *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, causados por agentes genotóxicos e por estresse oxidativo.

2.2- Objetivos Específicos

- Geração de linhagens nocautes em *T. cruzi* para os genes *msh2* e *msh6*;
- Avaliação da capacidade de sobrevivência de culturas tratadas com agentes genotóxicos, nos parasitos *T. cruzi msh2* e *msh6* nocautes;
- Determinação do acúmulo de lesões oxidativas no DNA nuclear e mitocondrial de parasitos selvagens e nocautes para os genes de reparo;
- Avaliação da infectividade de linhagens de *T. cruzi msh2* nocautes em diferentes linhagens celulares cultivadas *in vitro*;
- Determinação da localização subcelular de MSH2 e MSH6 em *T. cruzi* e *T. brucei* antes e após a exposição a agentes genotóxicos;
- Investigação da formação de complexos proteicos envolvendo as proteínas MSH2 e MSH6 por meio da geração de linhagens de *T. cruzi* e *T. brucei* expressando MSH2 e MSH6 com *tag* de c-myc e HA e ensaios de co-imunoprecipitação;
- Verificação de possíveis alterações na expressão gênica em *T. brucei* nocaute para o gene *msh2* por meio de RNA-seq;
- Verificação da expressão de enzimas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo;

3- Metodologia

3.1- Cultivo de parasitos

Culturas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas no estudo, clone CL Brener, foram mantidas na forma epimastigota a 28 °C em meio LIT (10 g/L de infuso de fígado; 4 g/L NaCl; 400 mg/L KCl; 8 g/L Na_2HPO_4; 1 g/L glicose; 5 g/L triptose; 10 mL de hemina a 0,2% em NaOH (p/v); pH 7,2), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, penicilina a 100 U/mL e estreptomicina a 100 μg/mL. Passagens foram realizadas semanalmente, exceto quando os parasitos foram utilizados em ensaios de susceptibilidade a drogas, quando repiques a cada 48 horas foram realizados para manter as culturas em fase exponencial de crescimento.

Culturas de *Trypanosoma brucei*, da cepa Lister 427 foram mantidas nas formas sanguínea e procíclica. A forma sanguínea foi mantida a 37 °C, 5% CO_2 em meio HMI-9 (um sachê HMI-9; 3g/L Na_2HPO_4; 14,3 μL/mL 2-mercaptoetanol) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado e passadas a cada 48 horas para que a densidade populacional fosse mantida entre 1 x 10^5 e 2 x 10^6 células/ mL. A forma procíclica foi mantida a 27° C em meio SDM-79 (um sachê de SDM-79; 2g/L Na_2HPO_4; 0,2% hemina) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado. As culturas foram mantidas com passagens semanais de modo que nunca ficasse a uma densidade menor do que 5 x 10^5 células/ mL.

3.2- Transfecção de parasitos:

3.2.1- Epimastigotas de *T. cruzi:*

Para os experimentos de transfecção foram utilizados 10^7 células/mL de parasitos na forma epimastigota em fase exponencial de crescimento. A quantidade de DNA foi

dependente do objetivo da transfecção. Nos experimentos de deleção gênica foram utilizados 100 μg de DNA, já nas transfecções para localização foram utilizados 100 μg do vetor pTREX_mRFP e 200 μg do pTREX_MSH6:RFP.

As culturas foram coletadas do meio LIT por centrifugação a 3000 x *g* por dez minutos a 4 ˚C e lavadas duas vezes em tampão PBS 1x (132 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na_2HPO_4; 1,5 mM KH_2PO_4; pH 7,2). Em seguida, foram novamente centrifugadas a 3000 x *g* por dez minutos a 4 ˚C e ressuspendidas em 900 μL de tampão de eletroporação [tampão CITOMIX (120 mM KCl; 0,15 mM $CaCl_2$; 10 mM K_2HPO_4; 2 mM EDTA; 5 mM $MgCl_2$; 25 mM Hepes; pH 7,4) e tampão Sacarose (277 mM sacarose; 7 mM KH_2PO_4; 1 mM $MgCl_2$; pH 7,4), na proporção 3:1]. Em cada cuveta de eletroporação de 0,2 cm (Gene Pulser BioRad) foram adicionados 400 μL da suspensão de parasitos e o DNA a ser incorporado. As cuvetas foram mantidas no gelo por quinze minutos, após os quais foram acopladas ao eletroporador BioRad Gene Pulser (Hercules, CA) ajustado para pulsos de 0.3 kV / 500 μF (2 pulsos com 10 s de intervalo entre eles), constantes de tempo entre 3 e 6 ms. Em seguida, foram incubadas à temperatura ambiente por dez minutos, após os quais o seu conteúdo foi transferido para 5 mL de meio LIT (Camargo, 1964) completo (10% soro fetal bovino + penicilina a 100 U/mL e estreptomicina a 100 μg/mL). As culturas transfectadas para nocautear genes foram mantidas no antibiótico de seleção correspondente.

3.2.2- Forma sanguínea de *T. brucei*:

O kit Amaxa Nucleofactor (Amaxa Biosystems) foi utilizado na transfecção de células na forma sanguínea. 30 mL de células a 1 x 10^6 células/ mL foi centrifugado e ressuspendido em 100μL da solução Amaxa Human T-cell. À cuveta de eletroporação própria para o eletroporador Amaxa adicionou-se 15μg do DNA a ser incorporado pelas

células transfectadas. Após a eletroporação as células são adicionadas ao meio de cultura HMI-9 (um sachê HMI-9; 3g/L Na_2HPO_4; 14,3 μL/mL 2-mercaptoetanol) suplementado com 20% de soro fetal bovino, antibiótico correspondente para seleção e incubadas a 37˚C, 5% CO_2.

3.3- Tratamento com agentes genotóxicos

3.3.1- Tratamento com Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2):

Para o tratamento com H_2O_2 pelo menos três passagens a cada 48 horas foram realizadas antes do tratamento, de forma que os parasitos *T. cruzi* na forma epimastigota fossem mantidos em fase log de crescimento. No momento do experimento, as culturas foram contadas e diluídas para $1x10^7$ em PBS 1x. Concentrações crescentes de H_2O_2 foram adicionadas aos tubos e incubados a 28 ˚C por 20 minutos, após esse intervalo os parasitos foram centrifugados e ressuspendidos em meio LIT e novamente incubados na estufa a 28 ˚C por 72h. A viabilidade celular foi medida contado os parasitos sobreviventes com o corante de exclusão vital Eritrosina B no hemocitômetro. Os experimentos foram realizados três vezes em triplicata. Para as culturas de *T. brucei* os parasitos da forma sanguínea foram diluídos para 1×10^6 células/ mL e incubados em meio HMI-9 a 37 ˚C, 5% CO_2, na presença ou ausência de H_2O_2 até o momento em que as células foram utilizadas. De modo similar, as culturas da forma procíclica tratadas com H_2O_2 foram diluídas para 5×10^5 células/ mL e incubadas com H_2O_2 a 27 ˚C em meio SDM-79 até o momento de serem utilizadas nos estudos realizados.

3.3.2- Tratamento com Cisplatina:

Parasitos na forma epimastigota de *T. cruzi* foram diluídos para $1x10^7$ células/mL em meio LIT e incubados com 100 μM de cisplatina (Sigma Aldrich) por 72 horas após as

quais a viabilidade celular foi medida contado os parasitos sobreviventes com o corante de exclusão vital Eritrosina B no hemocitômetro e o gráfico plotado em relação de porcentagem dos parasitos tratados em relação aos não tratados.

3.3.2- Tratamento com MNNG

Parasitos na forma epimastigota de *T. cruzi* foram diluídos para $1x10^7$ células/mL em meio LIT e incubados com 5 μM de N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, Tokyo chemical industry Ltd) por 72 horas após as quais a viabilidade celular foi medida contado os parasitos sobreviventes com o corante de exclusão vital Eritrosina B no hemocitômetro e o gráfico plotado em relação de porcentagem dos parasitos tratados em relação aos não tratados.

Parasitos da forma sanguínea de *T. brucei* foram incubados com concentrações crescentes de MNNG (400μM – 0,4μM) por 48 horas no meio de cultura correspondente a cada parasito e nas condições de cultivo descritas acima. Após as 48 horas de incubação foi utilizado o indicador redox Resazurin (Sigma-Aldrich) como forma de avaliar as células metabolicamente ativas. Esse sal é um indicador redox de metabolismo. Células com o metabolismo ativo mudam a cor do reagente de azul escuro para rosa. Após as 24 h de incubação a conversão metabólica do Resazurin é medida utilizando-se espectrofotômetro luminescência no comprimento de onda de emissão 590 nm. Com os dados obtidos foi calculado o IC50 para cada cultura.

3.4- Microscopia de fluorescência

Os parasitos transfectados para expressar proteínas fluorescentes foram lavados e ressuspendidos em PBS 1x, fixados com paraformaldeído 4%, colocados para aderir em lâmina de vidro e corados com DAPI (1000 μg/mL). As lâminas fixadas e seladas foram

levadas ao microscópio de fluorescência e observadas em objetiva de 60 x.

Já os parasitos expressando proteína em fusão com tag de c-myc ou HA foram centrifugados, lavados com PBS e fixados em paraformaldeído 4%. Em seguida, foram permeabilizados com 0,1 % Triton X-100 por 10 minutos. O Triton X-100 foi removido após sucessivas lavagens com PBS. As células foram, então, bloqueadas com 1% BSA, 0,2% Tween em PBS por uma hora à temperatura ambiente e em seguida incubadas com anticorpo anti-myc conjugado a Alexa 488 (Milipore) na concentração 1:500; ou anticorpo anti-HA (Roche) na concentração 1:50 e anticorpo secundário anti- rato (Molecular Probes/ Life Technologies). E finalmente, montadas em meio contendo DAPI. A localização subcelular da proteína em fusão foi visualizada em microscopia de fluorescência.

3.5- Infecção *in vitro* com *T. cruzi*

Culturas de *T. cruzi* na forma epimastigotas foram mantidas em meio LIT a 28 ˚C por aproximadamente duas semanas sem passagem ou adição de meio de cultura fresco. Quando parasitos na forma tripomastigota metacíclica foram visualizados em meio à forma epimastigota, 1 mL dessa cultura foi utilizado na infecção de células Vero, em meio DMEM (Gibco, preparado de acordo com instruções do fabricante e suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado), previamente aderidas em frascos de cultura de 75 cm^2. Em um primeiro momento, as células infectadas foram mantidas a 37 ˚C, 5% CO_2 por vinte e quatro horas. Em seguida, as culturas foram lavadas com PBS 1x para retirar os parasitos não internalizados. Adicionou-se o meio DMEM suplementado com soro de cavalo não-inativado (Gibco). As proteínas do sistema do complemento do soro eliminam as epimastigotas restantes. Com o objetivo de gerar tripomastigotas intracelulares, as culturas infectadas foram mantidas a 34 ˚C, 5% CO_2 até que as tripomastigotas

começassem a ser liberadas das células. Uma vez que o meio de cultura estava repleto de tripomastigotas, esse foi transferido para um tubo falcon de 50 mL e centrifugado a 2400 x *g* por 10 min. Sem que o pellet fosse perturbado, os tubos foram colocadas de volta na estufa 34 ˚C, 5% CO_2 por três a quatro horas. Dessa forma, apenas os parasitos viáveis são selecionados no sobrenadante.

As tripomastigotas obtidas com a primeira etapa de infeção foram contadas em câmera de Newbauer e a mesma quantidade de células da cultura selvagem e de três diferentes clones de parasitos MSH2 nocaute foram utilizadas para infectar macrófagos extraídos do peritônio de camundongos BALB/c por quatro horas. Os macrófagos extraídos foram colocados para aderir em lamínulas de vidro estéreis dentro de placas de 24 poços. Em cada um dos poços uma cultura diferente de tripomastigotas foi utilizada na infecção. Após as quatro horas de infecção, as células foram lavadas com PBS 1x para retirar as tripomastigotas que não internalizaram e incubadas em meio RPMI (GIBCO) a 37 ˚C, 5% CO_2. Quarenta e oito horas após a infecção, o meio RPMI (GIBCO) foi removido e as células lavadas com PBS 1x. As lamínulas foram retiradas dos poços e coradas com DAPI (1000 µg/mL). As células infectadas e o número de parasitos internalizados foram visualizados por microscopia de fluorescência.

3.6- Co- imunoprecipitação

A precipitação de proteínas marcadas com *tag* de c-myc foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Tiengwe e colaboradores (Tiengwe *et al.*, 2012). O extrato total de epimastigotas de *T. cruzi* expressando MSH2:myc, BSF de *T. brucei* expressando MSH2:myc e MSH6:HA e PCF *T. brucei* expressando MSH2:myc foram lisados por 2 horas a 4 ^{o}C em tampão WCE (50 mM HEPES pH 7.55, 100 mM NaCl, 1.0 mM EDTA, 1.0 mM EGTA, 10% glicerol, 1% Triton X-100 e inibidor de protease). Em seguida, o

lisado foi centrifugado e o sobrenadante adicionado a beads magnéticas (Life Technologies) previamente incubadas com anticorpo anti-myc (Millipore) por duas horas. As proteínas que não se ligaram (*flowthrough*) foram removidas após sucessivas lavagens e as proteínas que se ligaram eluídas em Tampão de Eluição (50 mM Tris.HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS) a 65 ^{o}C por 30 minutos. Alíquotas do lisado inicial, do lisado que não se ligou ao anticorpo (*flowthrough*) e do eluato foram reservadas para análise por *western blot*. As bandas do eluato presentes nas células expressando MSH2 com tag de c-myc mas não no selvagem foram excisadas e enviadas para sequenciamento por Espectrometria de Massa na Glasgow Polyomics (University of Glasgow College of Medical, Veterinary and Life Sciences).

3.7- Purificação de DNA Plasmidial

A extração de DNA plasmidial foi feita com o kit GFX Micro Plasmid Prep (GE Healthcare), conforme instrução do fabricante. Para obtenção de maiores quantidades de DNA foi realizada extração em grande escala (maxiprep) com o kit Qiagen Plasmid Maxi, de acordo com o protocolo do fabricante.

3.8- Reações de digestão enzimática

As clivagens de DNA com endonuclease de restrição foram realizadas com enzimas específicas para os sítios de restrição utilizados em cada reação de clonagem. A temperatura e tempo de incubação foi dependente do fabricante da enzima.

3.9- Purificação de fragmentos obtidos por PCR ou digestão enzimática e ligação em plasmídeos

Uma vez confirmada a PCR ou digestão por análise em eletroforese de gel de

agarose, a solução foi submetida à purificação em coluna com o Kit GFX^{TM} PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) de acordo com instruções do fabricante. Os DNAs purificados foram utilizados em reação de ligação com T4 DNA Ligase (Fermentas). A reação foi incubada por 3 horas a 22 ˚C e por 16 horas a 16 ˚C. Em seguida, foram utilizadas na transformação de bactérias competentes.

3.10- Transformação bacteriana

Nesse trabalho foram utilizadas *E. coli* pertencentes à linhagem Xl1- Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F´ *proAB lacI*^{q}*ZΔM15* Tn10 (Tet^{r})]). As transformações utilizando bactérias termocompetentes foram feitas com bactérias estocadas a -80 °C, após choque térmico com incubação a 42 ˚C por um minuto seguido de incubação no gelo por 5 minutos.

3.11- Construção dos vetores para obtenção de parasitos nocautes e para localização de proteínas:

3.11.1- MSH2_HX1_Neo_GAPDH_MSH2

A região codificadora de *Tcmsh2* (alelo C) foi clonada no vetor pGEM T-easy (Promega) e digerido com as enzimas de restrição *Xho*I e *Nhe*I. Aproximadamente 500 pares de base das porções N e C-terminal do gene foram purificadas juntamente com o restante do vetor, enquanto a região do meio foi descartada. Paralelamente, a sequência correspondente ao HX1_Neo_GAPDH foi amplificada por PCR com os iniciadores HX1 e GAPDHRevEcoRV (**Tabela 1**), a partir de um plasmídeo previamente construído e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Wanderson DaRocha da Universidade Federal do Paraná, e clonada no vetor pCR 2.1 TOPO (Life Technologies). As colônias em que o

inserto entrou na posição invertida foram selecionadas e denominadas TOPO_GAPDH_Neo_HX1. Uma das colônias selecionadas foi digerida com as enzimas de restrição *Spe*I e *Xho*I. O produto de digestão correspondente ao fragmento de GAPDH_Neo_HX1 foi purificado após eletroforese em gel de agarose e utilizado como inserto em reação de ligação com T4 DNA Ligase. A digestão com as enzimas *Nhe*I e *Spe*I geram extremidades que são compatíveis, possibilitando assim a ligação. O vetor obtido foi então denominado pGEM_MSH2_HX1_Neo_GAPDH_MSH2 e utilizado em reação de PCR para amplificar o cassete MSH2_HX1_Neo_GAPDH_MSH2 que foi utilizado na transfecção de parasitos selvagem e heminocautes para *Tcmsh2*.

3.11.2- MSH6_HX1_Neo_GAPDH_MSH6

A região codificadora de MSH6 foi interrompida pelo cassete HX1_Neo_GAPDH. A sequência correspondente ao HX1_Neo_GAPDH foi amplificada por PCR com os iniciadores HX1 e GAPDHRevEcoRV (**Tabela 1**) e clonada no vetor pGEM T-easy (Promega). O vetor denominado pGEM_HX1_Neo_GAPDH foi digerido com as enzimas de restrição *Sac*II e *EcoR*V. Paralelamente o vetor pCR 2.1 TOPO (Life Technologies) contendo a sequência codificadora correspondente *Tcmsh6* foi digerido com as enzimas *Sac*II e *Xmn*I. Os fragmentos digeridos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%. As bandas de interesse foram excisadas, purificadas e ligadas com T4 DNA Ligase.

A construção MSH6_HX1_Neo_GAPDH_MSH6 foi amplificada com os iniciadores MSH6For e MSH6Rev. O produto de PCR foi purificado e utilizado na reação de transfecção parasitos CL Brener selvagem. Após a transfecção os parasitos foram selecionados com 200 μg/mL de G418 por aproximadamente quatro semanas, quando foi visualizado que a cultura transfectada apenas com tampão não apresentava nenhum

parasito vivo, enquanto na cultura transfectada com o DNA para deleção foram visualizados os parasitos resistentes.

3.11.3- pTREX-mRFP

A sequência correspondente ao gene da proteína fluorescente vermelha, contendo mutações para que seja expressa na sua forma monomerica (mRFP), foi amplificada a partir do vetor pmRFP-C1 (cedido pelo Prof. Dawidson Gomes - UFMG) utilizando os iniciadores mRFPFor e mRFPRev. Os iniciadores foram desenhados de tal forma que o produto de PCR resultante contenha na sua extremidade sítios para as enzimas de restrição *Sma*I e *Xho*I. A PCR foi então clonada no vetor pCR2.1 TOPO (Life Technologies) e utilizado na transformação de bactérias quimiocompetentes XL1-Blue. O DNA extraído de diferentes colônias, utilizando o kit GFX *Micro* Plasmid Prep (GE Healthcare), foi submetido a digestão enzimática e aqueles que indicavam apresentar o inserto foram enviadas para reações de sequenciamento no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE). Uma das colônias que não apresentava nenhuma mutação foi selecionada para posteriores etapas de clonagem. O vetor Topo_mRFP foi digerido com as enzimas de restrição *Sma*I e *Xho*I e o fragmento correspondente ao gene de mRFP foi purificado e utilizado na reação de ligação com T4 DNA Ligase com o vetor pTREX_Neo previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. O vetor obtido, denominado pTREX_mRFP foi utilizado na transfecção de formas epimastigotas de *T. cruzi*. A expressão da proteína fluorescente foi visualizada em microscopia de fluorescência de parasitos fixados.

3.11.4- pTREX_MSH6:mRFP

Para a expressão da proteína TcMSH6 em fusão com a proteína mRFP foi utilizado o vetor pTREX_MSH6:mRFP, o qual foi transfectado em epimastigotas de *T. cruzi* na sua

forma episomal. Para tal, o gene *Tcmsh6* foi amplificado a partir do DNA genômico extraído da cepa CL Brener de *T. cruzi* utilizando os iniciadores MSH6LocFor e MSH6LocRev. O vetor (pTREX-mRFP) e o inserto (Tcmsh6) foram digeridos com as enzimas de restrição *Xba*I e *Sma*I e utilizados em reação de ligação com T4 DNA Ligase. As colônias obtidas foram analisadas por PCR de colônia, seguida por digestão enzimática com *Sac*I e *Hind*III. Uma das colônias foi enviada para reação de sequenciamento no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE) e uma vez confirmada que a sequencia não apresentava nenhuma mutação, essa colônia foi utilizada na extração de DNA plasmídial em larga escala (Maxiprep). Quarenta e oito horas após a transfecção os parasitos foram visualizados por microscopia de fluorescência.

3.11.5- TcMSH2:myc

A sequência parcial do gene *Tcmsh2* correspondente a 1350 pares de base da extremidade 3' foi amplificada utilizando os iniciadores TcMSH2SpeIF e TcMSH2SpeIR (**Tabela 1)** e clonada no vetor pCR 2.1 TOPO (Life Technologies). As colônias obtidas com a transformação foram analisadas com digestão enzimática com *EcoR*I, devido a um sítio de restrição presente no vetor e que libera um fragmento com o tamanho esperado para o inserto clonado, no caso aproximadamente 1350 pb. Os clones positivos foram confirmados ainda por sequenciamento realizado no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE). Esse plasmídeo denominado Topo_MSH2t foi digerido com a enzima de restrição *Spe*I e o fragmento resultante clonado no sítio de *Xba*I em um plasmídeo utilizado para expressão de proteínas com tag de c-myc em *T. brucei*, o qual contém 12 sequencias *in tandem* correspondentes ao epítopo QKLISEEDLPRE. A sequência de *Tcmsh2 in frame* com a sequência de c-myc foi novamente amplificada com os iniciadores TcMSH2CtBamHI e mycEcoRVR (**Tabela 1)** e clonada no vetor pCR 2.1

TOPO (Life Technologies). As colônias obtidas foram confirmadas por digestão enzimática e reação de sequenciamento. O vetor denominado Topo_MSH2t:myc foi digerido com as enzimas de restrição *Xho*I e *Xba*I e utilizado como vetor na reação de clonagem com o inserto correspondente à sequência de *gapdh*_Neo_*gapdh* derivado da digestão enzimática com *Xho*I e *Nhe*I do vetor pROCK_GFP_Neo (Darocha, Silva*, et al.*, 2004). As colônias obtidas com a transformação foram analisadas com digestão enzimática com *Sph*I e as positivas apresentaram fragmentos correspondentes a 5491 pb e 2512 pb. Em seguida o DNA do plasmídeo que apresentava o padrão esperado teve sua sequência confirmada por sequenciamento. O plasmídeo denominado Topo_MSH2t:myc_Neo foi linearizado com a enzima de restrição *Sal*I e utilizado na transfecção de formas epimastigotas de *T. cruzi*.

3.11.6- TcMSH6_HA

A sequência parcial do gene *Tcmsh6* correspondente a 1653 pares de base da extremidade 3' foi amplificada utilizando os iniciadores TcMSH6SpeIF e TcMSH6SpeIR (**Tabela 1**) e clonada no vetor pCR 2.1 TOPO (Life Technologies). As colônias obtidas com a transformação foram analisadas com digestão enzimática com *Eco*RI, devido a um síto de restrição presente no vetor e que libera um fragmento com o tamanho esperado para o inserto clonado, no caso aproximadamente 1653 pb. Os clones positivos foram confirmados ainda por sequenciamento realizado no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE). Esse plasmídeo denominado Topo_MSH6t foi digerido com a enzima de restrição *Spe*I e o fragmento resultante clonado no sítio de *Xba*I em um plasmídeo utilizado para expressão de proteínas com tag de hemaglutinina (HA) em *T. brucei*, o qual contém 6 sequencias *in tandem* correspondentes ao epítopo YPYDVPDYA. A sequência de *Tcmsh6 in frame* com a sequência de HA foi novamente amplificada com

os iniciadores TcMSH6CtEcoRIF e HAXhoIR (**Tabela 1**) e clonada no vetor pGEM T-easy (Promega). As colônias obtidas foram confirmadas por digestão enzimática e reação de sequenciamento. O vetor denominado Topo_MSH6t:HA foi digerido com as enzimas de restrição *Xho*I e *Xba*I e utilizado como vetor na reação de clonagem com o inserto correspondente à sequência de *gapdh*_Higro_*gapdh* derivado da digestão enzimática com *Xho*I e *Nhe*I do vetor pROCK_GFP_Higro (Darocha, Silva*, et al.*, 2004). O plasmídeo construído denominado pGEM_MSH6t:HA_Higro foi linearizado com a enzima de restrição *Kpn*I e utilizado na transfecção de formas epimastigotas de *T. cruzi*.

3.11.7- TbMSH6_HA

A sequência parcial do gene *Tbmsh6* correspondente a 1800 pares de base da porção 3' foi amplificada utilizando os iniciadores MSH6HAFor e MSH6HARev, que contém sítios de restrição para as enzimas *Hind*III e *Xba*I. O fragmento resultante da reação de PCR foi digerido com essas enzimas e utilizado em reação de ligação com T4 DNA Ligase no vetor que continha a sequência para codificar seis moléculas do epítopo YPYDVPDYA (HA - hemaglutinina) *in tandem*. O vetor construído, denominado TbMSH6:HA, foi linearizado com a enzima de restrição *Psi*I, que cliva aproximadamente na metade da sequência de *Tbmsh6* clonada em fusão com HA e utilizado na transfecção da forma sanguínea de *T. brucei*.

3.12- Detecção de 8-oxoguanina:

A medida de 8-oxoG foi realizada com base no princípio da afinidade de ligação da avidina conjugada a FITC à 8-oxoG (Struthers *et al.*, 1998). Foi utilizado um protocolo adaptado de (Maynard *et al.*, 2010). Aliquotas de 20 µL de suspensão de parasitos foram distribuídas em uma lâmina de vidro previamente tratada com poly-lisina (Sigma-Aldrich)

e deixadas para aderir por 5- 10 min após os quais as células foram fixadas com metanol gelado por 20 min a -20 ^{o}C. O metanol foi lavado com PBS 1x, as células permeabilizadas com 0.1% Triton X-100 por 3 min e incubadas com RNase A (100 μg/mL) por uma hora a 37 ^{o}C. Após lavagem com PBS 1x, as células foram tratadas com proteinase K (10 μg/mL) por 7 minutos à temperatura ambiente, seguido de tratamento dom HCl 4N por 7 min à temperatura ambiente e bloqueio por aproximadamente 16 horas com 10% soro fetal bovino em PBS 1x. A avidina-FITC foi diluída em solução de bloqueio (1:200) e incubada com as células por uma hora à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS 1x e montagem das lâminas com Prolong Gold anti-fade (Molecular Probes/ Life Technologies), as lâminas foram visualizadas em microscopia de fluorescência e imagens de pelo menos 10 campos diferentes capturadas. A intensidade de fluorescência foi medida utilizando-se o software ImageJ e plotada como unidades arbitrarias de fluorescência de 100 células.

3.13- RNAseq

O RNA das amostras enviadas para sequenciamento de RNA foram extraídos utilizando o kit RNeasy Mini (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante e sequenciadas utilizando o Illumina MiSeq. As análises de bioinformática foram realizadas por Nick Dickens (Wellcome Trust Center for Molecular Parasitology) utilizando o software bowtie2 para alinhamento das *reads* com o genoma de referência (Tb 927 – TriTrypDB versão 4.0) e cufflinks 2 para gerar os dados de abundância e a expressão diferencial.

3.14- Real Time PCR:

O RNA foi extraído utilizando-se o kit RNeasy Mini (Qiagen). Aproximadamente 1

µg de RNA de cada uma das culturas foi utilizado para síntese da fita de cDNA com o kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante, usando Random Primer. A concentração do cDNA sintetizado foi quantificada por fluorescência após incubação com Picogreen (Molecular Probes). 1 ng de cDNA foi utilizado em reação de PCR em tempo real com SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems) e 10 µM dos iniciadores FRDgF e FRDgR. Como controle endógeno foi utilizado iniciadores para amplificar o gene C1 (**Tabela1**).

Tabela 1 – Descrição de sequencia dos iniciadores utilizados no trabalho

Iniciador	**Sequencia 5` ➔ 3`**
mRFPFor	CCCGGGAAGAATTCATGGCCTCCTCCGAGGACGTCATC
mRFPRev	CTCGAGTTAGCCGGTGGAGTGGCGGCC
MSH6LocFor	CCCTCTAGACCTACGGGAATGGATGAC
MSH6LocRev	AAGCCCGGGACGACTTCTTTTTCTTG
MSH6HAFor	GGAAGCTTACTCTCATAT
MSH6HARev	TATCTAGACCGATGCGAGA
C1For	TTGTGACGACGAGAGCAAAC
C1Rev	GAAGTGGTTGAACGCCAAAT
FRDgF	CCCCGTGGGTTGTTGGTA
FRDgR	CTGATATACGACGCTTCCTTTGG
HX1	TTCTTCAAAATATGCAGCGG
GAPDHRevEcoRV	CCGATATCCCGGAGGGTCGCTCG
MSH6For	CTAGTTGACTGTGCGGACGTTTACCGC
MSH6Rev	TGAAGGAACTGTCGTATGGTATGAATG
8158For	TGAAATTTTGCTACGAGTGT
HygRev	TCAGAAGAACTCGTCCGGCCACA
7442For	GTGGAATGGGTTGCTCGTGCT
MSH6 5' KO	ATTTGAGGTTATTATTATTATTTATGC
Neo For	CGACCCTGCAGCCAATATGGGATCG
Neo Rev	TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG
TcMSH2SpeIF	CGACACTAGTATGACTGATGAACG
TcMSH2SpeIR	GAAGACTAGTGTAAAGCAAATAC
TcMSH2CtBamHI	AAGGATCCCTGATGGAACTGGAGGAAC
mycEcoRVR	ATCCGATATCTCACCTAGGCAG
TcMSH6SpeIF	ACGTACTAGTATGGATGACGC
TcMSH6SpeIR	ACGGACTAGTCGACTTCTTTT
TcMSH6CtEcoRIF	ACCGAATTCATGGTGGCATGGTCACAC
HAXhoIR	CGTCTCGAGCATTACCTACTGCTAATG

4. Resultados

4.1- Geração de linhagens de *T. cruzi* nocautes do gene *msh2*:

Devido ao fato da via de interferência de RNAi (RNAi) não ser funcional no *T. cruzi* (Darocha, Otsu, *et al.*, 2004), ao contrário do *T. brucei* (Alsford *et al.*, 2011), a única alternativa para estudos de função gênica em *T. cruzi* baseados no bloqueio da expressão do produto de um gene permanece sendo a deleção por recombinação homóloga das sequências correspondentes aos dois alelos desse gene no parasito. Entretanto, são poucos os trabalhos disponíveis na literatura que mostram a geração de parasitos nocautes nos quais ambos os alelos de um gene de cópia única foram deletados. Além disso, quando esse trabalho de Tese foi realizado ainda não havia sido descrita uma metodologia que aumente a eficiência de recombinação em *T. cruzi*, como o recentemente descrito sistema CRISP-Cas9 (Peng *et al.*, 2014).

Para a caracterização das proteínas da via de MMR em *T. cruzi*, nossos estudos foram iniciados com a tentativa de deleção dos dois alelos do gene *Tcmsh2*. A geração e caracterização de epimastigotas contendo um dos alelos do gene que codifica a proteína MSH2 deletado foi descrita por Campos e colaboradores (Campos *et al.*, 2011). Várias tentativas foram realizadas com o objetivo de gerar parasitos com os dois alelos de *msh2* deletados (nocaute nulo). Apesar de clones duplo-resistentes terem sido selecionados, nenhum clone no qual ambos alelos de *Tcmsh2* estivessem deletados foi obtido. O insucesso dessas tentativas nos levou a propor que a proteína pudesse ser essencial para o parasito. Como Xu e colaboradores haviam mostrado que a inclusão da 3'UTR do gene de *gapdh* aumenta a expressão de um gene de resistência (Xu *et al.*, 2009), decidimos usar uma nova estratégia de deleção, diferente da utilizada na deleção do primeiro alelo, que

consiste em transfectar os parasitos com construções nas quais o gene de resistência a droga está ligado a sequências que controlam o processamento do mRNA derivadas dos genes TcP2β e *gapdh*. Observamos que assim era possível obter clones nocautes com os dois alelos deletados. Para a deleção do primeiro alelo foi utilizada uma construção na qual a região codificadora do gene de resistência a Higromicina (Hyg^R) estava flanqueada por aproximadamente 500 pares de bases correspondentes às regiões 3' e 5' UTR do gene *Tcmsh2*, dessa forma toda a região codificadora de *msh2* foi substituída pela região codificadora de Hyg^R (Campos *et al.*, 2011). Nessa construção, portanto, a expressão de Hyg^R é dependente dos sinais para processamento do mRNA de *Tcmsh2*. Dentre os elementos necessários para o adequado processamento do mRNA primário em tripanosomatídeos, e que consequentemente um vetor de transfecção deve possuir, estão os sinais para adição da sequencia Spliced Leader (SL) *upstream* da região codificadora do gene exógeno por meio do processo de *trans- splicing* e sinais de poliadenilação inseridos *downstream* da região codificadora (Clayton, 1999; Teixeira e Darocha, 2003; Araújo e Teixeira, 2011). Uma vez que diferentes regiões 3' podem estar envolvidas no nível de expressão dos genes (Araújo *et al.*, 2011), optamos por uma abordagem na qual o gene de resistência a drogas fosse flanqueado por sequências sabidamente eficientes no processamento do mRNA com a adição de SL e cauda poli-A. Dentre as sequências já descritas e que já foram inseridas em diferentes vetores de expressão em *T. cruzi* estão as sequências denominadas HX1 (derivada da 5' UTR do gene TcP2β) e a região intergênica de *gapdh* (Vazquez e Levin, 1999; Darocha, Silva*, et al.*, 2004).

A construção para deleção do segundo alelo de *Tcmsh2* foi feita de forma que o gene de resistência a Neomicina (Neo^R) fosse flanqueado pelas sequencias HX1 e a região intergência de *gapdh*, como mostra a **Figura 5**. O "cassete de expressão" denominado HX1_Neo_GAPDH, flanqueado por sequências da região codificadora de *Tcmsh2*,

possibilita a substituição, por recombinação homóloga da região codificadora de *msh2* pela sequência do gene de resitência (**Figura 5**).

Parasitos heminocaute para *msh2*, previamente resistentes a Higromicina, foram transfectados com a nova construção contendo o gene de Neomicina Fosfotransferase (Neo^R) flanqueado por sinais de adição de SL e poliadenilação, além de sequências do segundo alelo de *Tcmsh2*. O processo de seleção dos transfectantes foi baseado no aumento crescente da concentração de G418 até atingir 200 μg/mL na cultura, que é a concentração comumente utilizada na seleção de parasitos com marcadores de resistência a Neomicina. Na primeira semana após a transfecção foi adicionado 100 μg/mL de G418. Ao longo das passagens a concentração foi aumentada para 150 μg/mL e finalmente para 200 μg/mL após aproximadamente 4 semanas de seleção. Somente após selecionarmos os parasitos resistentes a G418 é que foi adicionado Higromicina (200μg/mL) às culturas. Dessa forma, os parasitos não foram submetidos a altas doses de Higromicina e G418 nos momentos iniciais do processo de seleção. Uma vez selecionada uma população de parasitos resistentes a Higromicina e G418, essa população foi clonada em meio ágar sangue e os diferentes clones foram analisados por PCR do DNA genômico e *Northern Blot* (**Figura 6**). Para avaliar a integração no genoma da construção utilizada na transfecção foram feitas PCRs contendo iniciadores que se alinham especificamente no genoma, porém ausentes na construção utilizada, combinados a iniciadores presentes exclusivamente na sequência utilizada na transfecção. A integração da construção utilizada na deleção do primeiro alelo foi avaliada utilizando-se os iniciadores 8158For e HygRev (**Tabela 1**) , resultando em um amplicon de 2.1 kb.

Conforme observado no gel de agarose 1 % mostrado na **Figura 6A** a banda de DNA correspondente à amplificação com esses iniciadores é observada em dois dos clones de parasitos com um dos alelos deletados (*Tcmsh2*+/-) e também em clones de parasitos

com ambos os alelos de *Tcmsh2* deletados (*Tcmsh2-/-*). A integração da construção

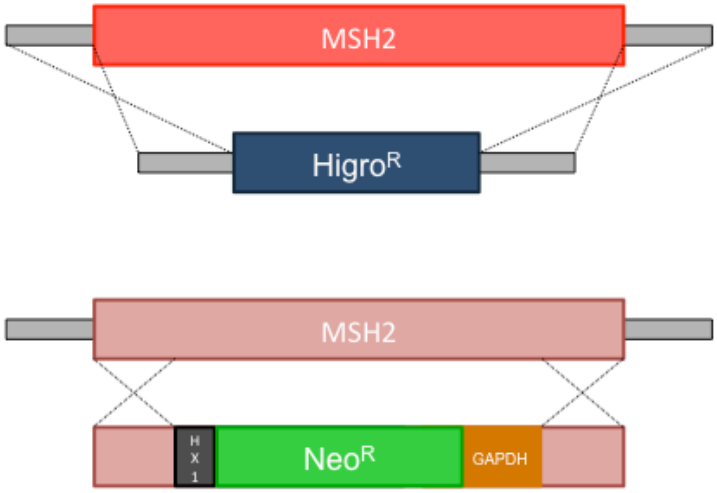
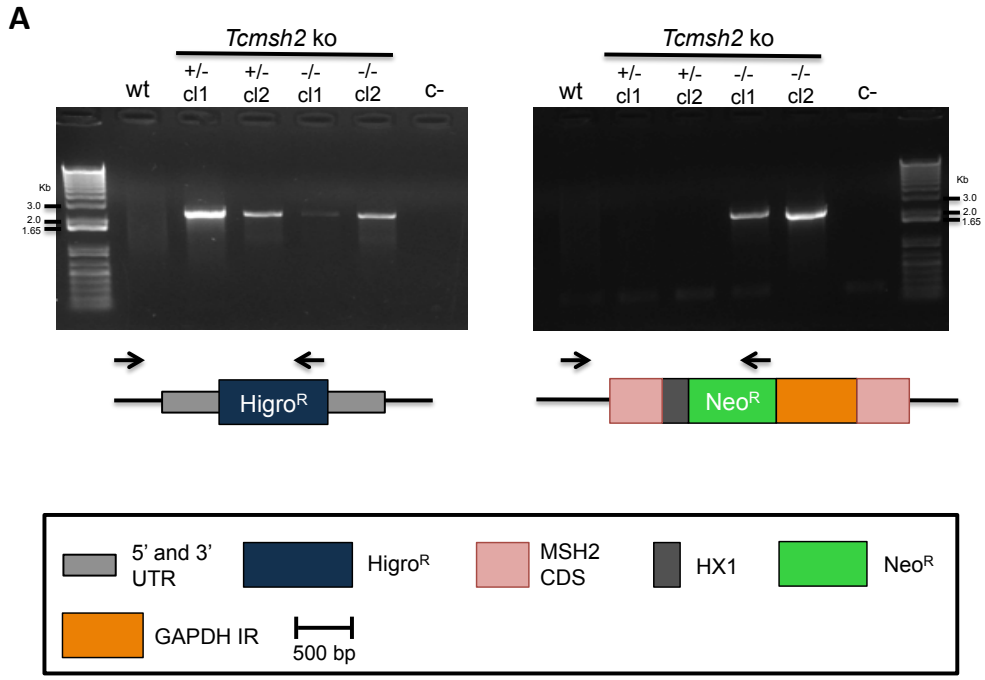


Figura 5: Representação esquemática da estratégia utilizada para gerar parasitos com os dois alelos de *Tcmsh2* deletados. A cepa CL Brener de *T. cruzi* foi utilizada para geração de clones nos quais ambos os alelos expressando a proteína MSH2 foram deletados. As diferentes cores (utilizadas para representar os alelos) evidenciam o caráter híbrido dessa cepa que expressa as isoformas B e C de TcMSH2 (Campos *et al.*, 2011). Primeiramente um dos alelos foi deletado por meio de recombinação homóloga utilizando-se as regiões 5´e 3´UTR (blocos cinza) do gene *Tcmsh2* flanqueando o gene de resistência a Higromicina. Os clones selecionados foram caracterizados por Campos *et al*. 2011. Para deletar o segundo alelo os parasitos foram transfectados com uma construção na qual o cassete contendo a região HX1, o gene de resistência a Neomicina e a região intergênica de *gapdh* foram flanqueados por pedaços da região codificadora de *Tcmsh2*.

utilizada na deleção do segundo alelo foi avaliada utilizando-se os iniciadores 7442For e NeoRev (**Tabela 1**), resultando em um amplicon de 2.1 kb. No gel de agarose 1 % mostrado à direita da **Figura 6A** a banda correspondente à amplificação é observada somente nos clones de parasitos com ambos os alelos de *Tcmsh2* deletados (*Tcmsh2-/-*).

Para determinar a expressão do gene *Tcmsh2* em culturas de parasitos selvagem (WT), com um dos alelos (*Tcmsh2+/-*) ou com ambos os alelos de *Tcmsh2* deletados (*Tcmsh2-/-*), uma membrana contendo o RNA total extraído dessas culturas foi hibridizado com uma sequência de 555 pares de base (pb) correspondentes à sequência parcial do gene *Tcmsh2* obtida após digestão enzimática com *Hind*III, purificação e marcação com [α-^{32}P]-dCTP. Como indicado na **Figura 6B**, a expressão de *Tcmsh2* é reduzida no clone no qual um dos alelos de *msh2* foi deletado quando comparada à cultura de parasitos selvagens, conforme já havia sido observado por (Campos *et al.*, 2011). A expressão de *Tcmsh2* não é detectada em três clones nos quais ambos os alelos codificadores da proteína MSH2 foram deletados. Mostrando que é possível obter clones nos quais os dois alelos de *msh2* em *T. cruzi* estejam deletados.

Mutantes nos quais os dois alelos de *msh2* estão deletados também foram obtidos na forma procíclica em *T. brucei* pelo grupo do Dr. Richard McCulloch, como pode ser visualizado nas figuras **S1** e **Fig 1A** do **Anexo 1**. Em *T. brucei* foram gerados ainda mutantes com os dois alelos de *mlh1* deletados.



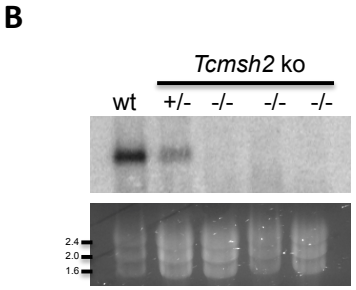


Figura 6: Análises de parasitos *Tcmsh2* nocautes. A) Os clones obtidos após a transfecção para deletar o segundo alelo de *msh2* foram avaliados por PCR do DNA genômico extraído de diferentes clones. Aqui estão representados dois clones de parasitos heminocautes (*Tcmsh2*+/-) e nocautes (*Tcmsh2*-/-). Foram utilizados iniciadores específicos para avaliar se a construção utilizadas nas transfecções haviam integrado nos locais esperados. Esses iniadores, conforme o mapa mostrado abaixo do gel de agarose 1%, anelam na região do genoma que não está presente na contrução utilizada para transfecção e na construção transfectada. **B)** Os clones selecionados foram avaliados também por *Northern Blot*. 20ug de RNA total de parasitos selvagem (WT), *msh2* heminocuate (+/-) e diferentes clones de *msh2* nocautes (-/-) foram transferidos para membrana de nylon e hibridados com sonda formada por sequencia parcial do gene *Tcmsh2* marcado com [α-^{32}P]-dCTP. Como controle da quantidade de RNA total aplicada no gel, na parte inferior da figura está a micrografia das bandas correspondentes ao rRNA coradas com brometo de etídio (EtBr).

4.2-Resposta de parasitos *Tcmsh2* nocautes a agentes genotóxicos

Inicialmente, verificamos se a ausência do gene *Tcmsh2* poderia interferir no crescimento do parasito. Entretanto, nenhuma diferença foi observada nas curvas de crescimento das formas epimastigotas em meio LIT devido à deleção de *Tcmsh2* (**Figura 7A**).

Uma das maneiras de se avaliar a funcionalidade da via MMR é através de tratamento com MNNG, uma droga alquilante que gera O^6-metilguanina (O^6-MeG). Células que apresentam deficiência no MMR são mais tolerantes aos danos gerados por agentes alquilantes (De Wind *et al.*, 1995). Com o objetivo de avaliar se os nocautes de *Tcmsh2* possuem a capacidade de corrigir O^6-MeG e indiretamente verificar a funcionalidade da via de MMR nos parasitos *msh2* nocautes esses foram submetidos ao tratamento com MMNG. Parasitos selvagem, *Tcmsh2+/-* e *Tcmsh2-/-* foram tratados com 5 μM de MNNG por 72 horas, e após o tratamento o número de parasitos foi determinado e plotado em porcentagem em relação ao número de parasitos nas culturas não tratadas (**Figura 7B**). Parasitos nocautes de um alelo ou de ambos alelos de *Tcmsh2* apresentaram maior tolerância frente ao tratamento com MNNG em relação aos parasitos selvagem, mostrando que na ausência de MSH2 a via do MMR é defeituosa em *T. cruzi*. A deleção de *msh2* e *mlh1* em *T. brucei* também resulta em um fenótipo de resistência ao MNNG, tanto na forma sanguínea (Machado-Silva *et al.*, 2008), quanto na forma procíclica (**Anexo 1 – Fig.2**).

Outra droga que pode ser utilizada para avaliar a função do MMR é a cisplatina. Essa droga é comumente utilizada no tratamento de células cancerosas e tem seu efeito citotóxico baseado na ligação ao DNA e formação de adutos que levam à distorção da hélice. Diferentes mecanismos de reparo de DNA podem estar envolvidos no reparo de adutos de cisplatina, entre eles o Reparo de Excisão de Nucleotídeos (NER), o Reparo de

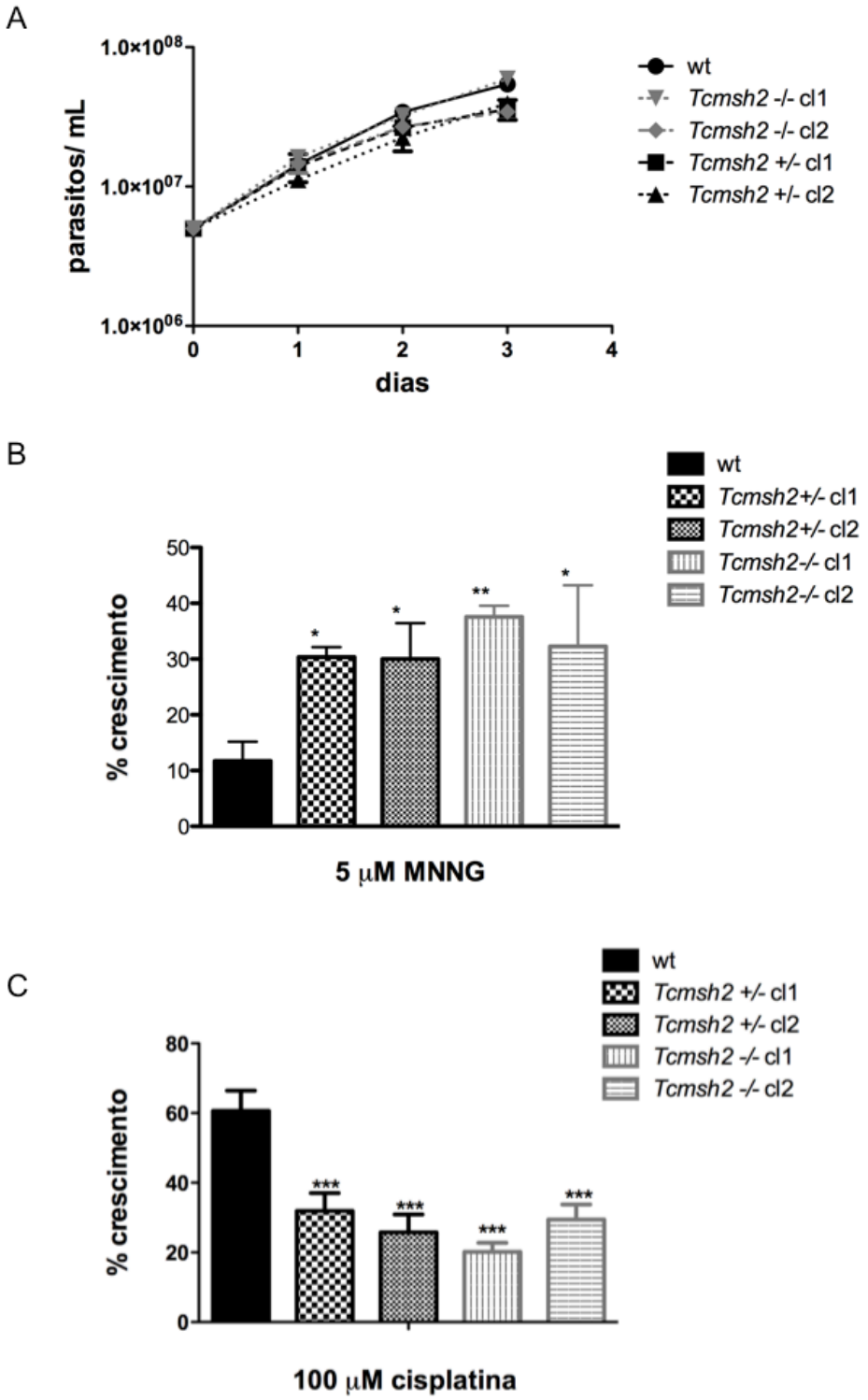


Figura 7: Crescimento de *Tcmsh2* nocautes frente a agentes genotóxicos. A) O crescimento de parasitos selvagem (wt), 2 clones de *Tcmsh2*+/- e 2 clones de *Tcmsh2*-/- foi acompanhado por 3 dias. Nenhuma diferença no crescimento foi observada. **B)** Os parasitos foram tratados com 5 μM de MNNG por 72 horas e o crescimento estimado como porcentagem em relação à mesma cultura de parasitos não tratada. **C)** Parasitos selvagem e *Tcmsh2* nocautes foram tratados com 100 μM de cisplatina por 72 horas e o crescimento estimado como porcentagem em relação à mesma cultura de parasitos não tratada. (***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05, one-way ANOVA com pós teste Bonferroni, em relação à cultura de parasitos selvagem).

Excisão de Bases (BER) e o MMR (Basu e Krishnamurthy, 2010; Galluzzi *et al.*, 2012; Kothandapani *et al.*, 2013). Como mostra a **Figura 7C**, todas as linhagens de *T. cruzi msh2* nocautes mostraram-se mais susceptíveis após o tratamento com 100 μM cisplatina.

4.3- Resposta de parasitos *msh2* nocautes ao estresse oxidativo

Parasitos *Tcmsh2* heminocautes (*Tcmsh2*+/-) são mais susceptíveis ao tratamento com H_2O_2 e acumulam mais guanina oxidada no DNA mitocôndrial (kDNA) (Campos *et al.*, 2011). Em *T. brucei*, a deleção de *msh2* resulta em um fenótipo de susceptibilidade ao H_2O_2 na forma sanguínea (Machado-Silva *et al.*, 2008). Esses resultados sugerem um papel da proteína MSH2 no reparo a danos oxidativos no DNA de *T. cruzi* e *T. brucei* (Machado-Silva *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2011).

Com o objetivo de avaliar a resposta ao H_2O_2 em diferentes clones de *T. cruzi* com os dois alelos de *msh2* deletados (*Tcmsh2* -/-), os parasitos foram tratatado com 75 μM de H_2O_2 por 20 minutos e após 72 horas tiveram a viabilidade celular avaliada. A exposição de epimastigotas *Tcmsh2*-/- ao H_2O_2 apresentou um resultado inesperado. Embora os parasitos *Tcmsh2*+/- sejam mais susceptíveis à exposição ao H_2O_2, quando avaliada a sobrevivência dos parasitos após o tratamento em relação às culturas selvagem (WT), observou-se um aumento significativo da tolerância ao H_2O_2 nos parasitos *Tcmsh2*-/- (**Figura 8**). Um resultado semelhante ao nocaute nulo de MSH2 na forma procíclica de *T. brucei*. Parasitos *Tbmsh2*+/- e *Tbmsh2*-/- são mais tolerantes ao tratamento com H_2O_2. Entretanto, nenhuma diferença é observada em relação ao nocaute de *mlh1* (**Anexo 1 – Fig. 3A).**

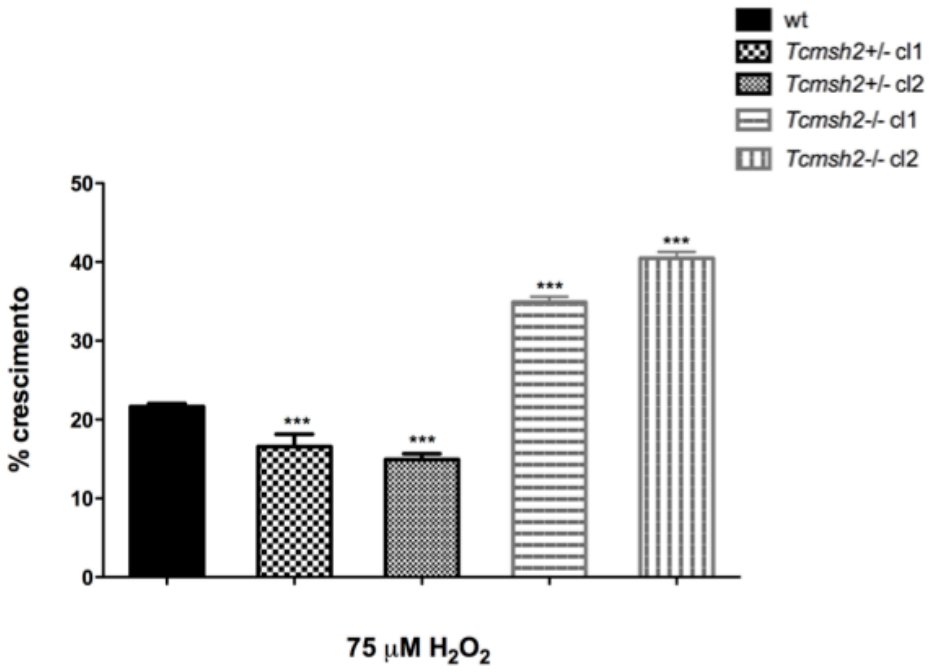


Figura 8: Resposta de *msh2* nocautes em *T. cruzi* ao estresse oxidativo gerado por H_2O_2. Parasitos selvagem (wt), heminocautes (+/-) e duplo nocautes (-/-) para a proteína MSH2 foram tratados com 75 μM de H_2O_2 por 20 min e depois incubados em meio LIT por 72 horas, após as quais foi determinado o número de parasitos que sobreviveram ao tratamento quando comparado aos parasitos não tratados. O símbolo de asterisco (*) refere-se à diferenças estatísticas significativas em relação ao controle constituído de parasitos WT também tratados com H_2O_2 (*** $P<0.001$, teste one-way ANOVA, seguido de teste Bonferroni).

4.4- Alterações na infectividade de *T. cruzi msh2* nocaute

A resposta imune do hospedeiro frente à infecção pelo *T. cruzi* é altamente complexa e envolve muitos fatores, tanto efetores quanto reguladores. Durante a fase aguda a imunidade inata tem grande importância, com a ativação de macrófagos que na tentativa de eliminar o parasito liberam enzimas lisossômicas e produzem espécies reativas de oxigênio. O *T. cruzi*, porém, tem grande capacidade de sobreviver e replicar nesse ambiente altamente hostil do hospedeiro (Basso e Marini, 2014).

Com o objetivo de avaliar o papel de MSH2 em outras fases do ciclo de vida de *T. cruzi* e também a capacidade que os parasitos *msh2* nocaute teriam para resistir ao ambiente altamente oxidante dentro dos macrófagos (Piacenza, Alvarez*, et al.*, 2009), três clones da linhagem *Tcmsh2*-/- e parasitos selvagem foram utilizados em ensaios de infecção em diferentes tipos celulares: células Vero e macrófagos intraperitoneais extraídos de camundongos BALB/c. Para isso, número equivalente de formas tripomastigotas desses parasitos, obtidas a partir de infecção inicial em cultura de células Vero, foram incubadas por 4 horas com células Vero (**Figura 9A**) ou macrófagos (**Figura 9B**) previamente aderidos a lamínulas de vidro. Após esse período as tripomastigotas que não invadiram as células foram lavadas e as células foram incubadas em meio RMPI por mais 48 horas a 37 ^{o}C 5% CO_2. Em seguida, o número de parasitos intracelulares foi determinado após coloração dos núcleos celulares com DAPI e visualização em microscópio de fluorescência (**Figura 9**).

O *T. cruzi* tem a capacidade de invadir e se multiplicar tanto em células não-fagocíticas, quanto células fagocíticas (Walker *et al.*, 2014). Os resultados dos ensaios de infecção de parasitos *Tcmsh2-/-* mostram que esses parasitos têm uma maior capacidade de sobreviver em macrófagos de camundongos BALB/c quando comparados a parasitos CL Brener selvagem, porém nenhuma diferença é observada quando os nocautes e o parasito

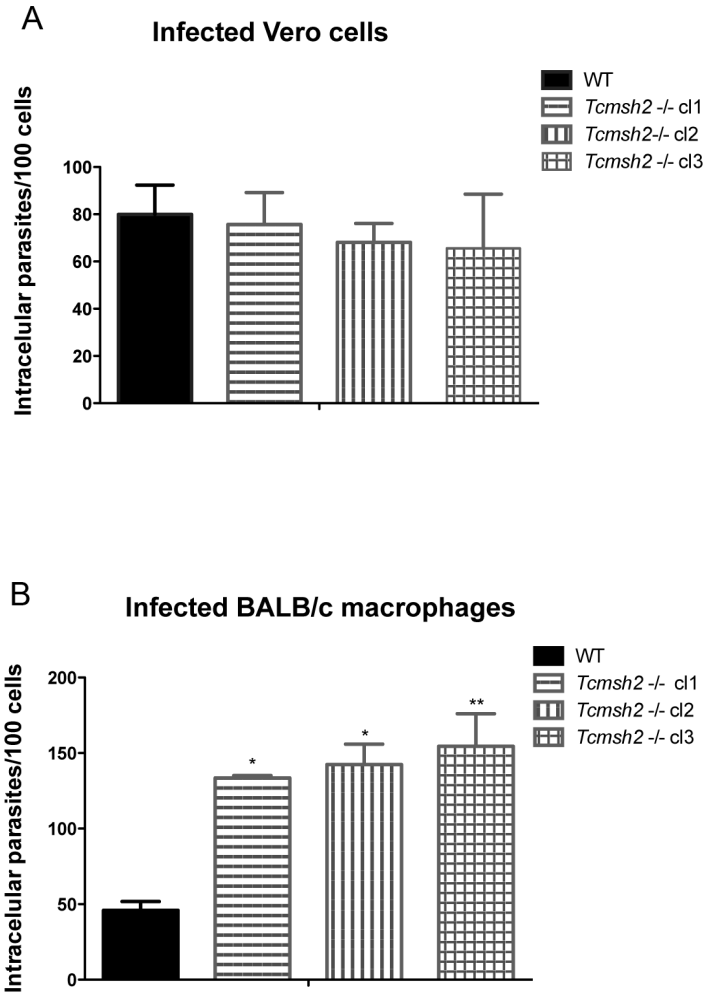


Figura 9: Infectividade de *Tcmsh2* nocautes. Diferentes tipos celulares foram avaliados frente à infecção com tripomastigotas de parasitos CL Brener selvagem (WT) e MSH2 nocautes. As tripomastigotas foram geradas em células Vero e número equivalente utilizado na infecção de **A)** células Vero e **B)** macrófagos intraperitoneais de camundongos BALB/c. A quantidade de parasitos intracelulares foi determinada 48 horas após o início da infecção. O símbolo de asterisco (*) refere-se à diferenças estatísticas significativas em relação à infecção controle WT (**P<0.01, *P<0.05, teste one-way ANOVA, seguido de teste Boferroni).

selvagem são utilizados na infecção de células Vero. Esse dado corrobora os resultados descritos na sessão anterior com relação ao tratamento com H_2O_2 e estão de acordo com a hipótese de que os parasitos nocautes para MSH2 teriam uma maior capacidade de adaptação a um ambiente altamente oxidante visto que macrófagos produzem naturalmente altos níveis de ROS por meio da ativação da NADPH oxidase (Forman e Torres, 2002).

4.5- Acúmulo de lesões oxidativas no DNA de parasitos *msh2* nocautes

Era esperado que parasitos duplo nocautes para *msh2* tivessem uma maior susceptibilidade ao estresse oxidativo. Os resultados inesperados apresentados acima: maior tolerância ao tratamento com H_2O_2 e maior acúmulo de amastigotas intracelulares em macrófagos infectados, nos levaram a investigar com maiores detalhes o fenótipo do acúmulo de lesões oxidativas nos parasitos nocautes de *msh2* em *T. cruzi* e em *T. brucei*. Ao contrário das culturas *Tbmsh2*+/- e *Tbmsh*2-/- que na forma procíclica são mais tolerantes ao H_2O_2, nenhuma diferença em relação à tolerância ou susceptibilidade frente ao tratamento com H_2O_2 é observada em parasitos nocautes para *Tbmlh1* (**Anexo 1 – Figura 3A**).

Para avaliar os níveis de 8-oxoG no DNA dos parasitos *msh2* nocautes nas formas epimastigotas de *T. cruzi* e procíclica de *T. brucei*, além de *mlh1* nocautes na forma procíclica de *T. brucei*, utilizamos uma estratégia baseada na afinidade da avidina pela 8-oxoG. A guanina modificada uma estrutura muito similar à biotina, com a qual a avidina se liga com grande avidez (Struthers *et al.*, 1998). Na **Figura 10A** está representada a estrutura similar da 8-oxoG (mas não da guanina) com a biotina. O aumento de 8-oxoG em condições de estresse oxidativo foi verificada usando a avidina conjugada ao FITC após incubação em parasitos selvagens não tratados e tratados por 30 min com 75 μM H_2O_2

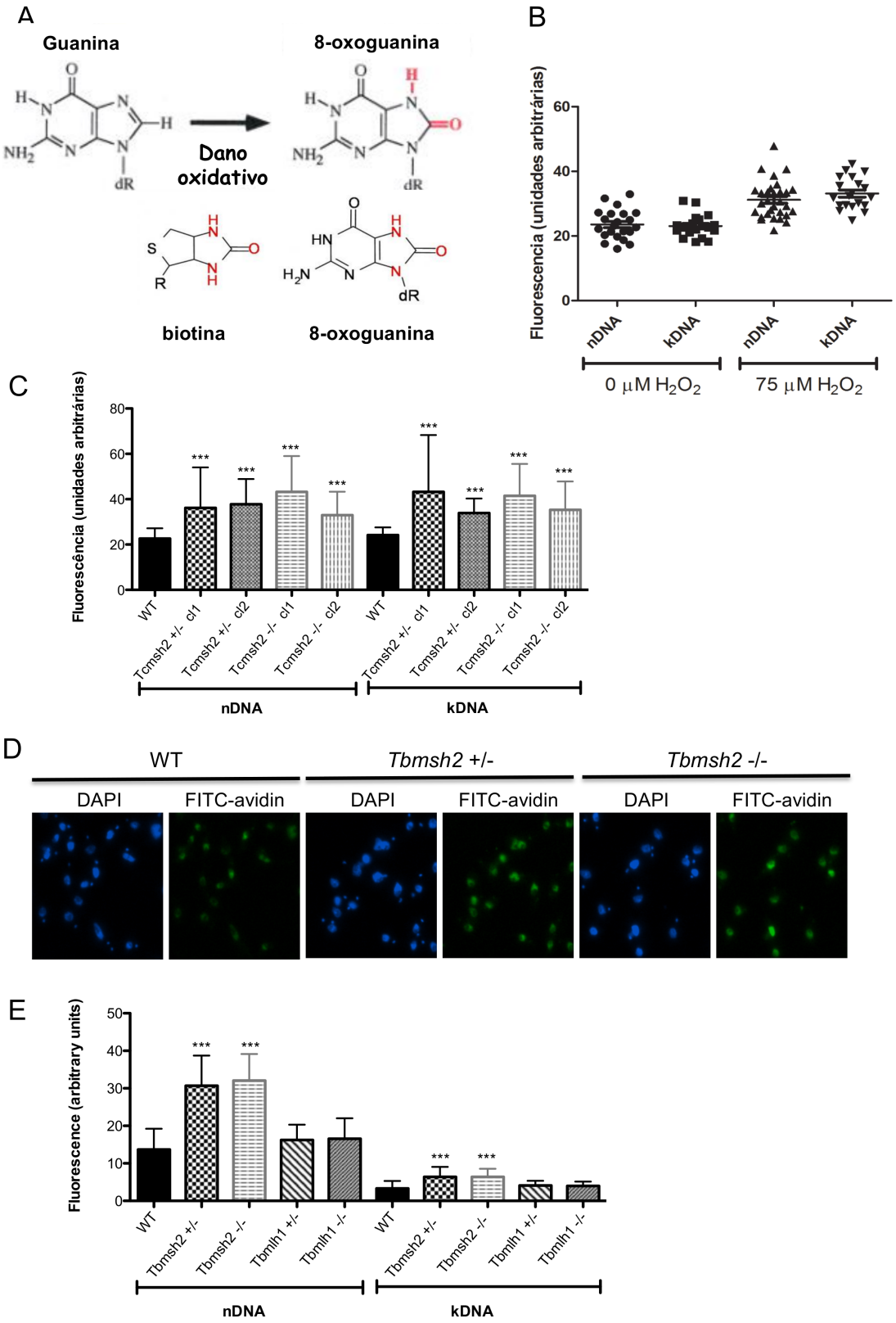


Figura 10: Detecção de 8-oxoG no DNA de tripanosomas. A) A similaridade estrutural entre a 8-oxoG e biotina permite que a avidina conjugada a um fluorófilo possa ser

utilizada para a dectação de 8-oxoG intracelular, uma vez que a avidina além de se ligar à biotina, pode também se ligar à 8-oxoG. **B)** O acúmulo de 8-oxoG foi determinado utilizando avidina conjugada a FITC em parasitos selvagem após o tratamento com 75 μM H_2O_2 por 20 minutos. A quantidade de lesão foi estimada baseado na intensidade de fluorescência emitida pelo núcleo e kDNA, como uma medida indireta da quantidade de avidina_FITC ligada. A intensidade de fluorescência foi medida usando o software imageJ e plotada como unidade arbitrária de fluorescência. **C)** Quantidade de 8-oxoG nos nocautes de msh2 em *T. cruzi.* D) O mesmo protocolo foi utilizado para medir 8-oxoG em *T. brucei* na forma procíclica. E) Quantificação da intensidade de fluorescência no núcleo e kDNA de *T. brucei* WT, *Tbmsh2+/-*, *Tbmsh2-/-*, *Tbmlh1+/-* e *Tbmlh1-/-*. O símbolo de asterisco (*) refere-se à diferenças estatísticas significativas em relação ao controle wt (*** P<0.001, teste one-way ANOVA, seguido de teste Bonferroni).

(**Figura 10B**). A quantificação de 8-oxoG no DNA da célula foi determinada pela intensidade de fluorescência emitida pelas células no DNA nuclear e no kDNA por meio do software ImageJ. É possível observar um aumento de 8-oxoG tanto no DNA nuclear e quanto no mitocondrial (kDNA) dos nocautes de *msh2* em *T. cruzi* e *T. brucei*. Na **Figura 10C** vemos o acúmulo de 8-oxoG no nDNA e kDNA para os nocautes de *msh2* em *T. cruzi*. Na **Figura 10D** está mostrado o acúmulo de 8-oxoG nos nocautes de *msh2* na forma procíclica de *T. brucei* após a marcação com avidina-FITC e coloração do núcleo e kDNA com DAPI. Parasitos *Tbmsh2* nocautes acumulam mais 8-oxoG no nDNA e kDNA, enquanto nenhuma diferença foi observada para os nocautes de *Tbmlh1* na forma procíclica (**Figura 10E**).

4.6- Análise do transcriptoma de parasitos *msh2* nocautes em *T. brucei*

Como mostrado nos itens anteriores, a perda de MSH2 está relacionada a um fenótipo de resistência ao estresse oxidativo observado na infecção de macrófagos e também em epimastigotas de *T. cruzi* e procíclicos em *T. brucei* tratados com H_2O_2. Além disso, dados obtidos pelo grupo do Dr. Richard McCulloch mostram que a complementação de *Tbmsh2-/-* na forma procíclica com gene *msh2* restaura a função da via de reparo de MMR (observado após tratamento com MNNG), mas não reverte a tolerância ao H_2O_2 (**Anexo 1 – Fig. 6 A** e **B**). Esses dados nos levaram a propor que a perda de *msh2* nesses parasitos é acompanhada de um processo de adaptação das células os permitiram a sobrevivência na ausência completa da proteína MSH2 em condições de elevado estresse oxidativo. O papel de MSH2 na resposta ao estresse oxidativo seria mais preponderante nas formas epimastigotas de *T. cruzi* e nas formas procíclicas em *T. brucei*, as quais são formas presentes no hospedeiro invertebrado e que possuem um metabolismo

essencialmente aeróbico (Hannaert *et al.*, 2003), capaz de gerar níveis mais elevados de ROS quando comparados com formas tripomastigotas (*T. cruzi*) e sanguíneas (*T. brucei*).

Como estratégia para avaliar quais alterações no metabolismo poderiam estar ocorrendo nos parasitos que tiveram os dois alelos de *msh2* deletados e identificar genes que pudessem ter tido sua expressão alterada com a deleção do gene de *Tbmsh2* foi realizada a análise de transcriptoma de parasitos *msh2* nocautes na forma sanguínea de *T. brucei.* Uma vez identificados esses genes, os quais possivelmente estariam envolvidos na resposta desses nocautes ao estresse oxidativo, seria possível propor um mecanismo de adaptação dessas células nocautes para lidar com o estresse oxidativo. RNA de parasitos selvagem, *msh2* heminocautes (*Tbmsh2*+/-) e *msh2* nocautes (*Tbmsh2*-/-) da forma sanguínea foram extraídos e sequenciados utilizando a plataforma de sequenciamento Illumina MiSeq instalada na Universidade de Glasgow. As reads foram geradas por sequenciamento paired-end, multiplexed em uma corrida. As análises foram feitas utilizando o bowtie2 para alinhar as reads com o genoma de referencia Tb927 (TriTrypDB versão 4.0) e o cufflinks2 para gerar a abundancia e expressão diferencial. Para tal, as reads resultantes do sequenciamento de *Tbmsh2*+/- e *Tbmsh2-/-* foram analisadas juntas, uma vez que o fenótipo de susceptibilidade a H_2O_2 é semelhante nas duas culturas (não mostrado), e comparadas às reads obtidas a partir da cultura selvagem. Um aumento de 2.0 (log2) do mRNA para *msh2* é observado em parasitos selvagem quando comparados aos nocautes. Os únicos outros RNAs que apresentaram diferença estatisticamente significativa na sua expressão ($p<0.05$) codificam as enzimas Fumarato Redutase dependente de NADH glicosomal e mitocondrial. No genoma de *T. brucei* são encontrados 3 genes de FRD dependente de NADH. Na forma procíclica são expressas as proteínas FRDg dependente de NADH no glicossomo (denominada FRDg) e na mitocôndrial (denominado FRDm1). A outra isoforma chamada FRDm2 não teve sua localização determinada, e pouco se sabe

sobre ela. Essas enzimas são responsáveis pela redução do fumarato em uma reação dependente de NADH com a produção de succinato, que é o produto final principal do metabolismo de glicose na forma procíclica (Coustou *et al.*, 2005).

Tabela 2: RNAseq de parasitos *T. brucei* (forma sanguínea) *msh2* nocautes. Níveis de expressão dos genes que tiveram a sua expressão alterada quando os parasitos *msh2* nocautes são comparados a parasitos selvagem, estão listados abaixo.

Gene	ID	Expressão no hemi e duplo nocautes	Expressão no selvagem	Log2 (fold-change)
DNA mismatch repair protein, putative, MSH2 (MSH2)	Tb927.10.11020	14.6611	59.7394	2.02669
NADH-dependent fumarate reductase (FRDg)	Tb927.5.930	29.3525	62.7884	1.09701
NADH-dependent fumarate reductase, putative (FRDm1)	Tb927.5.940	42.6162	82.9019	0.960002

Para validar os dados obtidos com o RNAseq e testar se essa alteração na expressão de FRD também é observada nos mutantes de *msh2* na forma procíclica, iniciadores que alinham exclusivamente no gene NADH- dependente fumarate reductase glicosomal (FRDg) (Tb927.5.930) foram sintetizados e utilizado para análise da expressão relativa do RNA correspondente por PCR quantitativa do cDNA. Para tal, o mRNA foi extraído das formas sanguínea e procíclica de parasitos selvagem e *Tbmsh2* +/- e -/-. O ensaio foi realizado três vezes em triplicata e a média dos dados obtidos plotados no gráfico da

Figura 11A. A expressão relativa do mRNA para FRDg na forma procíclica é maior que a observada na forma sanguínea. Esse dado também foi observado por Coustou e colaboradores (2005). Como esperado, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi detectada nos níveis de mRNA de FRDg entre os parasitos selvagem e *msh2* nocautes na forma sanguínea. Porém, na forma procíclica vê-se uma diminuição de 1.5 vezes dos níveis de FRDg quando comparado parasitos *msh2* nocaute nulo com selvagem e heminocaute.

Para avaliar se a diminuição dos níveis de mRNA observado em duplo nocautes de *msh2* na forma procíclica estaria correlacionada à diminuição dos níveis dessa proteína, o extrato proteico total das culturas de parasitos selvagem e *msh2* nocautes (formas sanguínea e procíclica) foi transferido para membrana de nitrocelulose, e após separação em gel de poliacrilamida 10% incubados com anticorpo anti-FRDg (gentilmente cedidos pelo Professor Frédéric Bringaud – Université Bordeaux Segalen) (**Figura 11B**). Como controle da quantidade de proteína aplicada no gel foi utilizado anticorpo anti-EF1α (Millipore). Como mostrado na **Figura 11B**, uma proteína com peso molecular semelhante ao predito (de 123 kDa) foi detectada nos extratos de formas procíclica, mas, como esperado, uma vez que formas sanguíneas possuem um metabolismo anaeróbico, não foi observada em extrato de parasitos na forma sanguínea (dados não mostrados). Análises da densitometria das bandas correspondentes à FRD em relação ao controle realizada com dois experimentos independentes e utilizando o software ImageJ, mostra uma diminuição de aproximadamente 2 vezes nos níveis de FRDg nos parasitos *msh2*-/- quando comparados ao selvagem e ao heminocaute. Esses dados sugerem que a diminuição da expressão de Fumarato Redutase dependente de NADH pode fazer parte do mecanismo de adaptação sofrido pelos parasitos para lidar com o estresse oxidativo na ausência de MSH2 na forma procíclica de *T. brucei*. *Western blot* para quantificar a expressão da FRD de *T.*

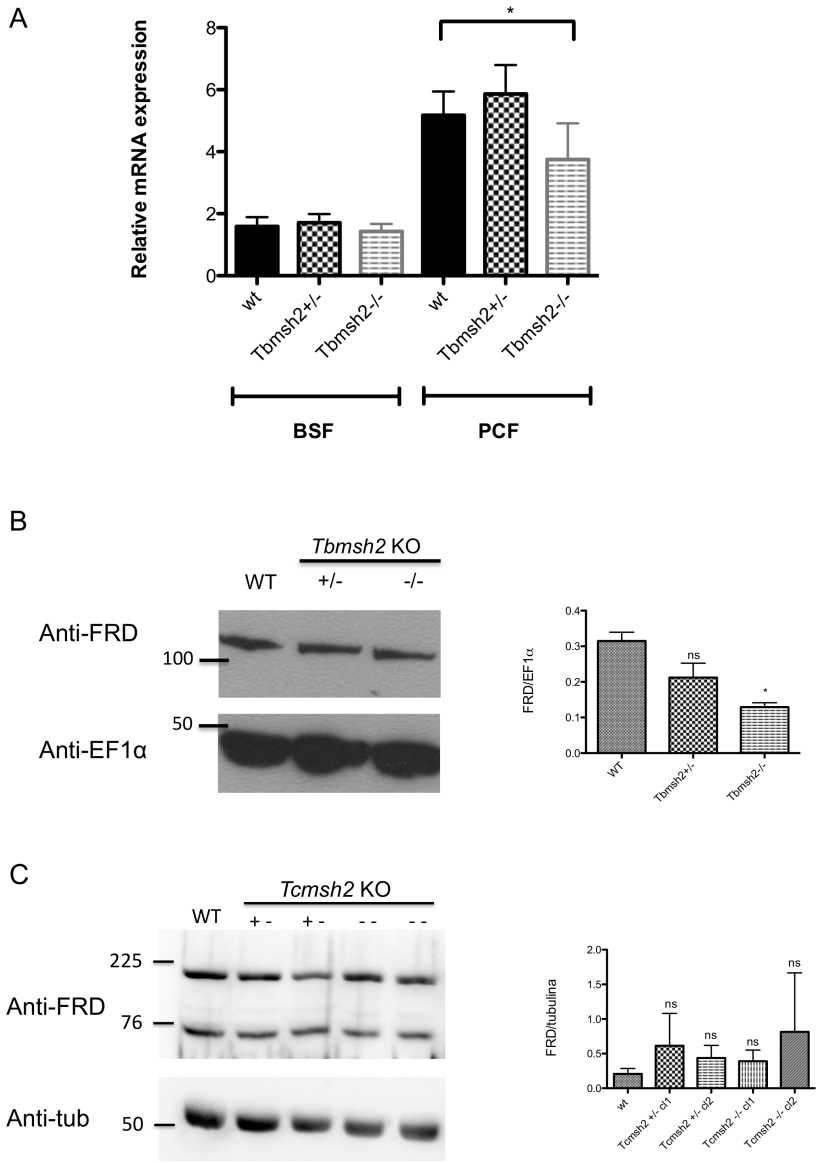


Figura 11: Avaliação da expressão de FRD em *T. brucei* e *T. cruzi*. A) A expressão relativa de FRDg foi avaliada por PCR quantitativa do cDNA de parasitos na forma sanguínea (BSF) e procíclico (PCF), selvagem (wt), MSH2 heminocaute (2+/-) e duplo nocaute (2-/-). O gráfico representa a média de três experimentos independentes. **B)** *Western blot* de extrato total de parasitos selvagem (WT), MSH2 heminocaute e duplo nocaute nas formas selvagem e procíclico. Quantidades equivalentes de extrato para todas as culturas analisadas foi transferida para a membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com anticorpo anti-FDR (1:5000) e anti-camundongo (1:10000) para identificar a proteína de tamanho esperado 123 KDa e com anti-EF1α (1:25000) e anti-coelho (1:10000) como normalizador da quantidade de proteína aplicada no gel. A densitometria das bandas foi feita e plotada como relação FRD/EF1α. **C)** Expressão de FRD em *T. cruzi* selvagem, *Tcmsh2*+/- e *Tcmsh2*-/-. A membrana de *western blot* foi incubada com anti- FRD (1:2000) e como controle da quantidade de proteína foi utilizado anti- tubulina (1:5000). O gráfico de intensidade das bandas refere-se à média da proporção FRD/tubulina da banda de menor peso molecular de três experimentos independentes (*P<0.5; ns= não significativo)

cruzi também foram realizados (**Figura 11C**). As análises de densitometria das bandas correspondentes à FRD em relação ao controle (alfa-tubulina), realizada em três experimentos independentes, utilizando o software ImageJ não mostraram diferenças estatisticamente significativas nos níveis de expressão entre os parasitos WT e *msh2* mutantes para as duas proteínas de peso molecular distinto (o gráfico mostrado ilustra a quantificação da banda de menor peso molecular). Não existem ainda estudos que correlacionem as sequências das duas isoformas de FRD em *T. cruzi* com a sua localização sub-celular. Apesar da anotação do genoma de *T. cruzi* atualmente disponível pelo TriTrypDB (versão 9.0) possuir sequências truncadas correspondentes à Fumarato Redutase NADH-dependente em *T. cruzi*, foi possível identificar três sequencias completas que provavelmente condificam as diferentes isoformas dessa enzima: TcCLB.508535.10, TcCLB.510215.10 e TcCLB.503849.60. A sequência TcCLB.508535.10 codifica uma proteína de 132 KDa, com um sinal mitocondrial N-terminal predito pelo MitoProt II com probabilidade de 0.63. Enquanto, TcCLB.510215.10 e TcCLB.503849.60 codificam, respectivamente, proteínas com peso molecular de 124 KDa e 85 KDa. Nenhum sinal mitocondrial foi predito para essas sequências.

4.7- Expressão de enzimas envolvidas da resposta ao estresse oxidativo em nocautes de MSH2 em *T. cruzi*

Como mostrado anteriormente, diferente do observado para *T. brucei*, nenhuma alteração estatisticamente significativa na expressão da enzima fumarato redutase dependente de NADH foi observada na forma epimastigota de *T. cruzi* quando parasitos WT e *msh2* nocautes foram comparados. Com o objetivo de avaliar se uma adaptação das formas epimastigotas de *T. cruzi* envolvendo alterações na expressão de enzimas ligadas à

resposta ao estresse oxidativo poderia ter ocorrido, foram feitos *western blots* nos quais extrato de parasito selvagem, TcMSH2+/- e TcMSH2-/- foram incubados com anticorpos anti-tripanotiona redutase (TR) e anti- superóxido dismutase A (FeSOD-A) (gentilmente cedido pela Dra. Silvane Murta – CpqRR) (**Figura 12**). Nenhuma diferença foi observada na expressão de TR. Enquanto a expressão de FeSOD-A apresenta um aumento médio de 1.7 a 1.9 vezes nos nocautes de *msh2* comparados à cultura de parasitos selvagem. Conforme descrito com maiores detalhes na Introdução (**ítem 1.6**), a enzima superóxido dismutase catalisa a conversão de ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, enquanto a tripanotiona redutase catalisa a regeneração da tripanotiona reduzida (Turrens, 2004). Estudos adicionais ainda são necessários para entender o mecanismo de adaptação de parasitos para lidar com o estresse oxidativo na ausência de *msh2*.

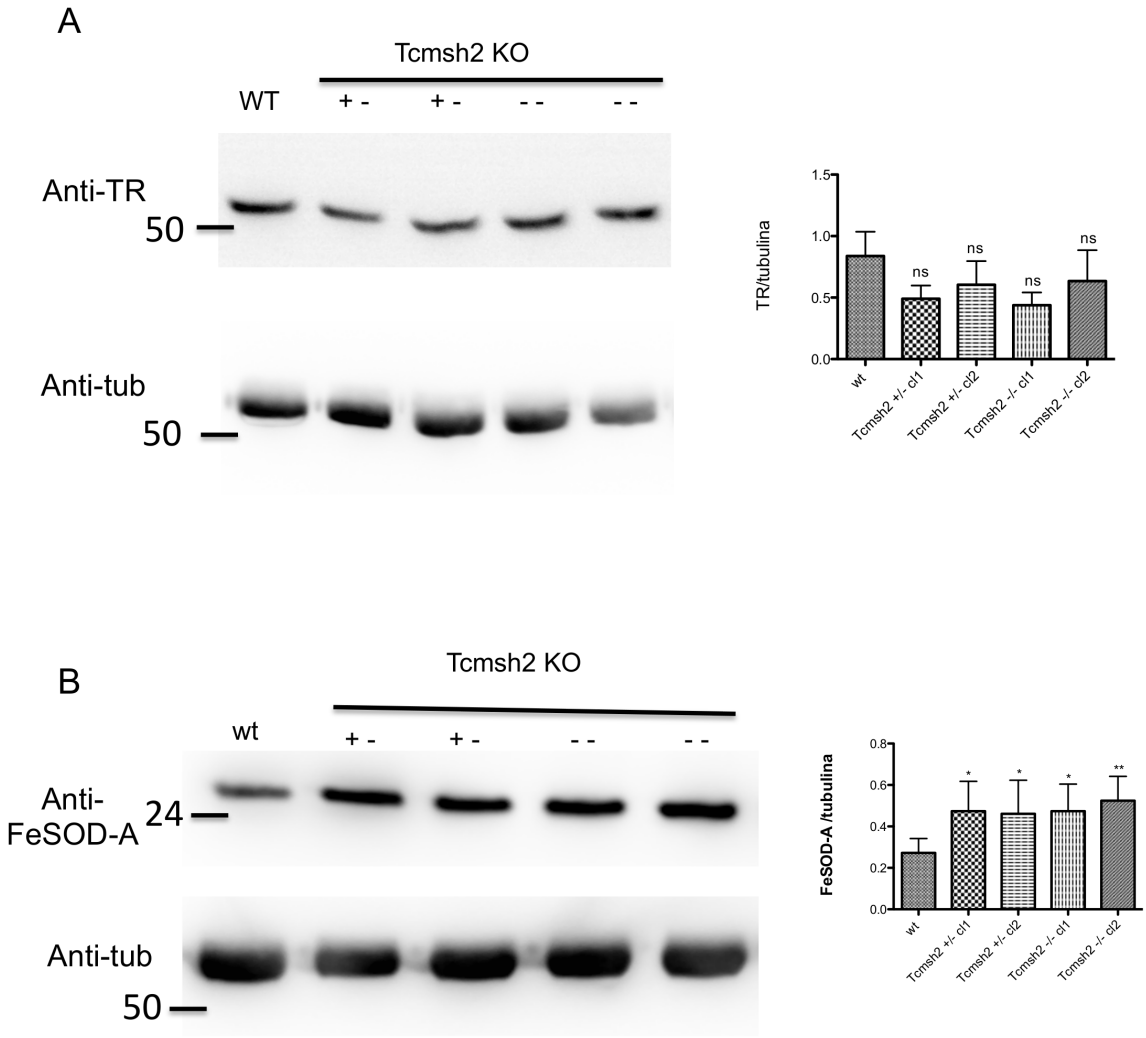


Figura 12: Avaliação da expressão de enzimas da resposta ao estresse oxidativo nos nocautes de *msh2* em *T. cruzi.* A) *Western blot* de extrato total de parasitos selvagem (WT), MSH2 heminocaute e duplo nocaute incubados com anti- tripanotiona redutase (anti-TR 1:2000) e anti-coelho (1:5000) para identificar a proteína de tamanho esperado 53.8 KDa. como controle da quantidade de proteína foi utilizado anti- tubulina (1:5000). O gráfico de intensidade das bandas refere-se à média da proporção TR/tubulina de três experimentos independentes. **B)** *Western blot* de extrato total de parasitos selvagem (WT), MSH2 heminocaute e duplo nocaute incubados com anti-FeSOD-A (1:5000) e anti- rabbit (1:10000). Como controle da quantidade de proteína foi utilizado anti- tubulina (1:5000). O gráfico de intensidade das bandas refere-se à média da proporção FeSOD-A/tubulina de três experimentos independentes. (*P<0.5; ns= não significativo)

4.8- Caracterização das proteínas que interagem com MSH2 em T. brucei e *T. cruzi*

A identificação das proteínas que interagem com MSH2 na forma sanguínea e procíclica de *T. brucei* e em *T. cruzi* pode contribuir para o entendimento do mecanismo de resposta ao estresse oxidativo observado nesses organismos. E também do processo de adaptação nos nocautes de MSH2 na forma procíclica em *T. brucei* e em epimastigotas de *T. cruzi*.

Como estratégia foram investigadas primeiramente as proteínas que interagem com MSH2 na forma sanguínea de *T. brucei*. Para tal, foram gerados por T. Zeb (University of Glasgow) parasitos mutantes no qual um dos alelos de *msh2* havia sido deletado. O segundo alelo foi substituído por recombinação homóloga pela sequência de *msh2* conjugada a um *tag* contendo o epítopo c-myc. Os parasitos transfectados para expressão de TbMSH2:myc foram avaliados por tratamento com MNNG. Lembrando que após tratamento com MNNG o reconhecimento da lesão pelo MMR ativa a maquinaria de reparo de DNA (Wyatt e Pittman, 2006). Dessa forma, foi possível verificar se a proteína MSH2 expressa com um *tag* de myc ainda seria funcional. Observou-se que os parasitos expressando TbMSH2:myc respondiam ao tratamento com MNNG de maneira similar ao observado para parasitos *Tbmsh2* com um dos alelos deletado (dado não mostrado). Os parasitos expressando a proteína MSH2 com *tag* de myc foram, ainda, submetidos ao tratamento com concentrações crescentes de H_2O_2 (dado não mostrado). Foi possível concluir-que o tag de 12-myc não interfere no papel da proteína MSH2 na via de MMR e na resposta ao estresse oxidativo, tanto na forma procíclica quanto na forma sanguínea de *T. brucei*. Caso o *tag* estivesse influenciando no funcionamento na proteína, os parasitos

transfectados teriam fenótipo semelhante aos parasitos nocaute homozigoto e não ao heminocaute.

Os parasitos expressando MSH2:myc foram utilizados em experimento de imunoprecipitação utilizando-se anticorpos anti-myc. A fim de validar o protocolo de imunoprecipitação para essas células recombinantes selecionamos uma proteína que é expressa em *T. brucei* e que sabidamente interage com MSH2 em organismos eucariotos. Como descrito anteriormente, uma das interações muito bem caracterizadas no MMR de eucariotos ocorre entre MSH2 e MSH6 formando o heterodímero MutSα. Para confirmar essa interação em *T. brucei*, a proteína TbMSH6 foi expressa com *tag* de HA (epitopo da hemaglutinina).

A reação de recombinação foi planejada para que o gene de *Tbmsh6* fosse alvo da recombinação e esse *locus* passasse a expressar *Tbmsh6* em fusão com *tag* de HA (conforme esquematizado na **Figura 13**). A construção foi utilizada na transfecção de duas culturas da forma sanguínea de *T. brucei*. Em uma das culturas um dos alelos de *Tbmsh6* havia sido deletado, fazendo com que o alelo restante fosse o alvo da recombinação. Os clones obtidos na transfecção dessa cultura foram denominados TbMSH6:HA. Outra cultura expressando *Tbmsh2* fusionado a um tag de myc (TbMSH2:myc) também foi transfectada para expressar MSH6:HA e denominada TbMSH2:myc/MSH6:HA. Os clones obtidos foram avaliados por PCR do DNA genômico extraído dos parasitos transfectados (**Figura 14A**) e por *western blot* (**Figura 14B**). Conforme observado, apenas em extrato total de parasitos transfectados para expressar TbMSH6 com um tag de HA foi possível detectar banda após marcação com anticorpo anti-HA.

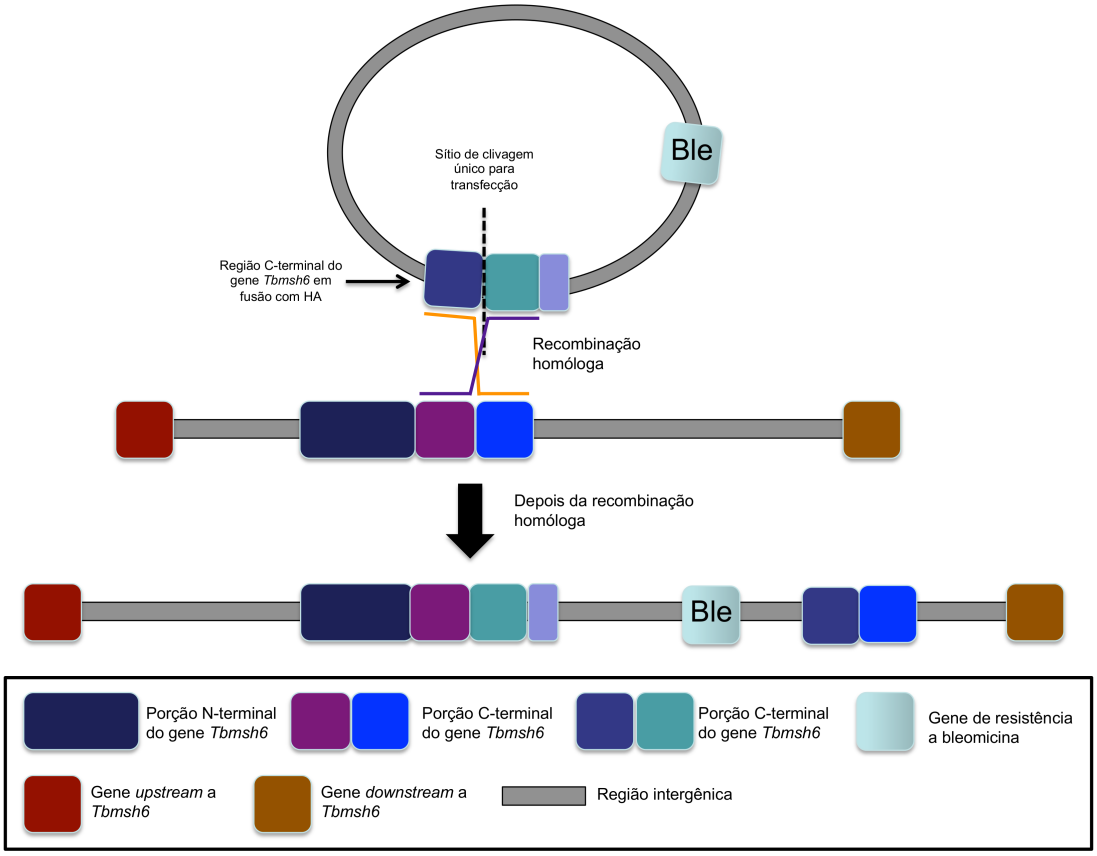


Figura 13: Estratégia utilizada na recombinação do vetor para expressão de MSH6 com *tag* 6-HA. A sequência correspondente à região C-terminal do gene *Tcmsh6* (sem o códon de parada) foi amplificada e clonada em fusão com o a sequência para codificar o epítopo 6-HA. Em seguida, um sítio de restrição único presente aproximadamente no meio da sequência da região C-terminal clonada foi utilizado na linearização do vetor antes da transfecção. Após a transfecção a região C-terminal do gene *Tbmsh6* endógeno foi substituída por recombinação homóloga pela região C-terminal do mesmo gene fusionada ao *tag* 6-HA.

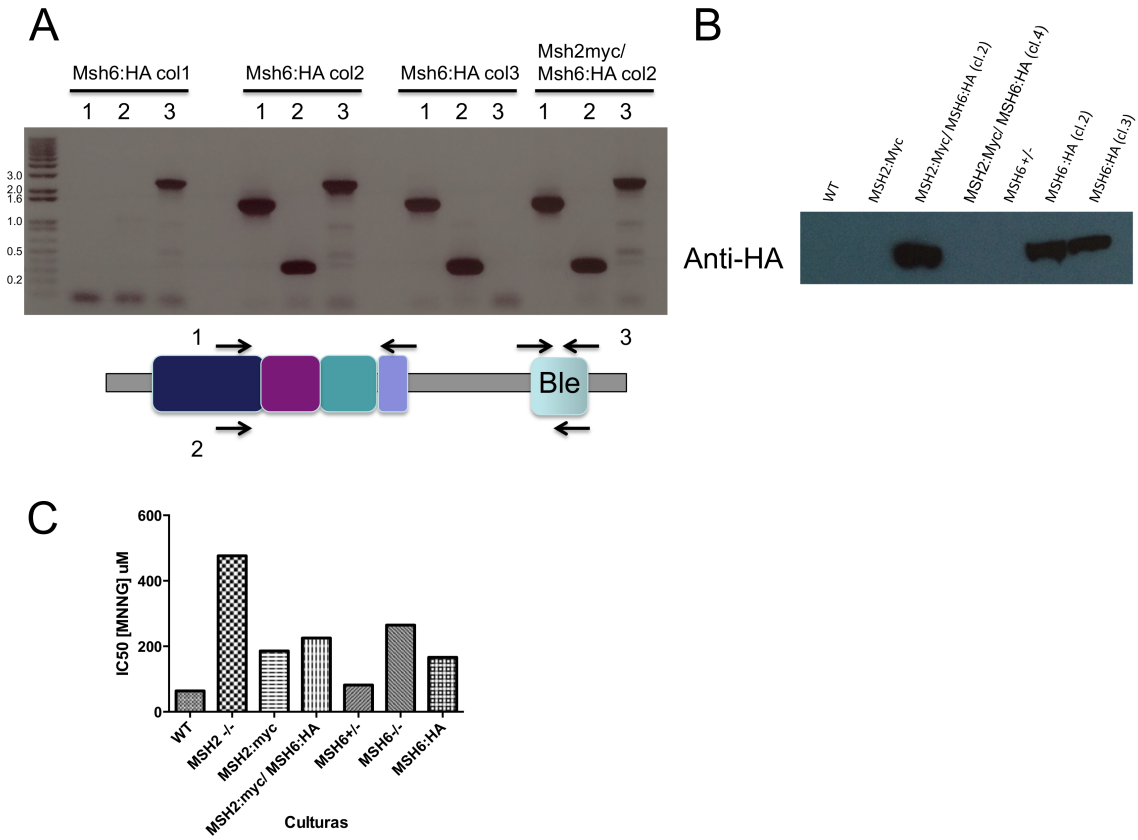


Figura 14: Caracterização de clones da forma sanguínea de *T. brucei* expressando MSH6:HA. **A)** PCR de colônia de DNA genômico extraído de parasitos transfectados para expressar MSH6:HA (colônias 1-3) e MSH2:myc/ MSH6:HA (colônia 2). Os pares de iniciadores marcados como: (1) MSH6intF e HA-rev amplificam um fragmento de 1568 pares de bases; (2) MSH6intF e BleoR amplificam um fragmento de 2548 pares de bases; (3) BleoF e BleoR amplificam um fragmento de 370 pares de bases. **B)** Extrato total de parasitos selvagem (WT), expressando MSH2 com tag de myc (MSH2:myc), expressando MSH2 com tag de myc e MSH6 com tag de 6-HA (MSH2:myc/MSH6:HA), MSH6 heminocaute e expressando MSH6 com tag de 6-HA (MSH6:HA) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e transferidos para membrana de nitrocelulose para hibridização com anticorpo anti-HA (1:5000). Somente nas culturas transfectadas com a construção para expressão de MSH6 foi possível detectar a banda correspondente à proteína com tag de HA. **C)** Tratamento das culturas com concetrações crescentes de MNNG por 48 horas e avalição da viabilidade celular por reação com Resazurin.

Para avaliar a atividade proteína MSH6 expressa com o tag de HA, os parasitos foram incubados com diferentes concentrações de MNNG de 400μM a 0.39μM. As seguintes culturas foram utilizadas no tratamento: selvagem (WT), MSH2 duplo nocaute (MSH2-/-), MSH2 expresso com tag de c-myc (MSH2:myc), MSH2 expresso com tag de myc e MSH6 com tag de HA, MSH6 heminocaute, MSH6 com ambos os alelos de *msh6* deletados e MSH6 expresso com tag de HA. Os resultados obtidos após o tratamento com MNNG sugerem que os parasitos transfectados são capazes de expressar formas funcionais das proteínas TbMSH2 e TbMSH6 com *tag* de myc e HA, respectivamente (**Figura 14C**). Uma vez que a expressão das proteínas com tag não representam um aumento significativo na tolerância ao MNNG, o que seria de se esperar de células que apresentam um MMR defectivo, conforme discutido anteriormente.

Parasitos na forma sanguínea de *T. brucei* selvagem, expressando MSH2:myc e MSH2:myc/MSH6:HA foram lisados e incubados com anticorpo anti-myc ligado à esferas magnéticas Dynabeads (Life Technologies). As proteínas presentes no lisado que não se ligaram ao anticorpo foram transferidas para um novo tubo e armazenadas. As proteínas que se ligaram ao anticorpo foram eluídas e transferidas para um novo tubo. Alíquotas das proteínas eluídas, juntamente com as proteínas totais presentes no lisado inicial e as proteínas do lisado que não se ligaram ao anticorpo foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% e após a corrida transferidos para membrana de nitrocelulose para *western blot* utilizando os anticorpos anti-myc e anti-HA (**Figura 17A**). O restante do produto da eluição de proteínas presentes em parasitos selvagens e parasitos expressando MSH2:myc/ MSH6:HA foi concentrado por centrifugação a vácuo (SpeedVac – Eppendorf) e aplicado em gel de poliacrilamida 10%. O gel foi corado com Comassie Coloidal e as bandas que foram visualizados no extrato de parasitos MSH2:myc/ MSH6:HA, mas não visualizadas no extrato de parasitos selvagens, foram excisadas e

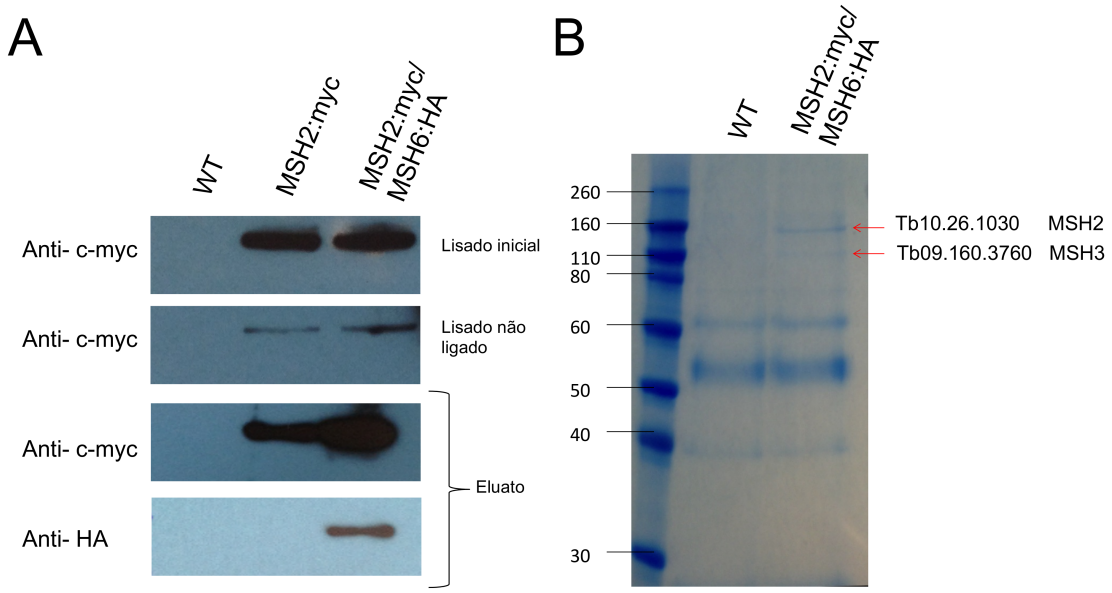


Figura 15: Co- imunoprecipitação de TbMSH2 na forma sanguínea. A) Proteínas do extrato total da forma sanguínea de *T. brucei* de parasitos selvagem (WT), mutantes expressando MSH2:myc e MSH2:myc/ MSH6:HA foram imunoprecipitadas utilizando-se anticorpo anti-myc. Amostras do lisado inicial, do lisado que não se ligou ao anticorpo e do eluato transferidas para membrana de nitrocelulose foram incubadas com anti-myc (1:7000) e anti-HA (1:5000). **B)** Gel de poliacrilamida corado com Comassie Coloidal. As bandas presentes apenas no extrato do eluato de MSH2:myc/ MSH6:HA mas não no extrato de parasitos selvagem (WT) foram identificadas por Espectrometria de Massa.

enviadas para análise por Espectrometria de Massa na Glasgow Polyomics (University of Glasgow College of Medical, Veterinary and Life Sciences). As proteínas identificadas pelo software MASCOT estão apresentadas na **Figura 15B** ao lado da banda correspondente no gel de poliacrilamida. As únicas bandas presentes no eluato do extrato da cultura de parasitos MSH2:myc/MSH6:HA, mas ausentes no eluato de parasitos selvagem (WT) representam as proteínas MSH2 e MSH3. Apesar da interação entre MSH2 e MSH6 não ter sido observada no gel de poliacrilamida corado com Comassie Coloidal, a mesma foi confirmada por *western blot* utilizando anticorpo anti-HA (**Figura 15A**).

Uma vez que por *western blot* e pela co-imunoprecipitação de MSH2:myc e MSH6:HA foi possível identificar proteínas que interagem com MSH2 em *T. brucei* na forma sanguínea, concluímos que essa metodologia também poderia ser utilizada para a forma procíclica, sem no entanto utilizar como controle positivo a proteína TbMSH6 com *tag* de HA. O mesmo protocolo de extração e imunoprecipitação foi utilizado para a forma procíclica de culturas de parasitos selvagem e expressando MSH2:myc. Na **Figura 16** pode ser visualizado o *Western Blot* realizado para confirmar a precipitação de MSH2, bem como o gel de poliacrilamida 10% corado com Comassie Coloidal do eluato final (**Figura 16B**). Ao lado do gel de poliacrilamida do eluato final estão identificadas as bandas que estão presentes no extrato derivado de MSH2:myc, mas não em extrato de parasitos selvagem. Essas bandas foram excisadas e enviadas para sequenciamento por Espectrometria de Massa. A proteína identificada como Tb10.70.0420, apesar de ter sido anotada como MSH8 é o homólogo para a proteína MSH6 eucariótica (Bell *et al.*, 2004).

Foi possível, portanto, demonstrar que tanto na forma sanguínea quanto na procíclica a proteína MSH2 de *T. brucei* interage com as proteínas MSH3 e MSH6. Esses experimentos de co-imunoprecipitação foram repetidos com extratos proteicos de parasitos tratados com H_2O_2 e MNNG, entretanto nenhuma banda adicional foi visualizada (dados

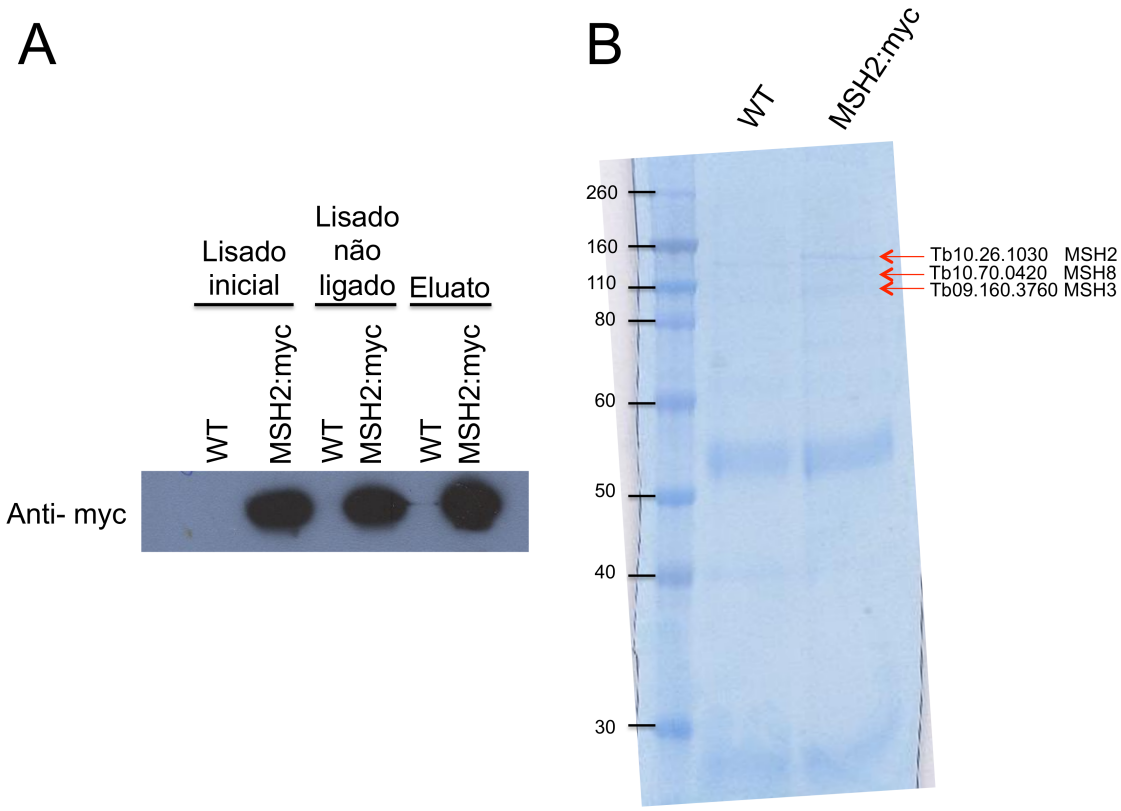


Figura 16: Co- imunoprecipitação de TbMSH2 na forma procíclica. A) Proteínas do extrato total da forma procíclica de *T. brucei* de parasitos selvagem (WT) e mutantes expressando MSH2:myc foram imunoprecipitadas utilizando-se anticorpo anti-myc. Amostras do lisado inicial, do lisado que não se ligou ao anticorpo e do eluato transferidas para membrana de nitrocelulose foram incubadas com anti-myc. **B)** Gel de poliacrilamida corado com Comassie Coloidal. As bandas presentes apenas no extrato do eluato de MSH2:myc mas não no extrato de parasitos selvagem (WT) foram identificadas por Espectrometria de Massa**.**

não demonstrados). Os dados obtidos nos ensaios de co-imunoprecipitação sugerem que apenas as interações mais fortes, os heterodímeros MSH2-MSH6 (MutSα) e MSH2-MSH3 (MutSβ), puderam ser identificadas.

Em *T. cruzi* também foram gerados parasitos expressando MSH2 em fusão com tag de c-myc. Para tal, foi utilizada uma estratégia similar à esquematizada na Figura 13 para expressão de MSH6:HA em *T. brucei*. A expressão de MSH2:myc em *T. cruzi* nos parasitos transfectados, foi primeiramente verificada por *western blot* contendo extrato proteico total de parasitos selvagem (WT) e quatro diferentes clones de parasitos selecionados após transfecção com a construção para expressar MSH2:myc. A **Figura 17** mostra que para três dos clones selecionados, mas não no extrato de parasitos selvagem é possível observar uma proteína de tamanho correspondente ao esperado de 124 kDa para MSH2 em fusão com *tag* de c-myc, após incubação da membrana de *western blot* com anticorpo anti-myc (1:5000). Uma vez confirmada a expressão de MSH2:myc por *western blot* o extrato total desses parasitos foi utilizado para imunoprecipitação em protocolo igual ao descrito anteriormente para *T. brucei.* Anticorpos anti-*myc* aderidos a esferas magnéticas foram incubados com extrato total de parasitos selvagem e expressando MSH2:myc. A proteína MSH2 ligada ao anticorpo pelo tag de *myc* foi recuperada e posteriormente eluída. A **Figura 18A** mostra um *western blot* incubado com o anticorpo anti-myc, contendo extrato proteico de epimastigotas de *T. cruzi* utilizado como *input* (antes da separação com as beads), o extrato de proteínas que não se ligaram ao anticorpo (*flow through* - FT) e as proteínas eluídas após a precipitação. Embora o extrato inicial (*input*) aplicado no gel corresponda a cerca de 1 x 10^7 parasitos, não foi possível detectar MSH2:myc, sendo a proteína detectada somente no extrato concentrado resultante da eluição, ou seja, MSH2:myc imunoprecipitada pelo anticorpo anti-myc. Com o objetivo de identificar outras proteínas que poderiam estar associadas a MSH2 no *T. cruzi* foi feita a

coloração com comassie coloidal das proteínas presentes no eluato após concentração e separação em gel de poliacrilamida 10% (**Figura 18B)**. As setas a direita indicam a posição das bandas correspondentes às proteínas presentes no extrato de *T. cruzi* expressando TcMSH2:myc, mas ausentes no extrato de *T. cruzi* WT também submetido a imunoprecipitação com anti-myc ligado às beads magnéticas. As bandas correspondentes foram excisadas e enviadas para identificação por espectrometria de massas. Até o momento não foi possível identificar nenhuma proteína que poderia fazer parte do imuno-complexo ligado as beads. Apesar de essa metodologia ter se mostrado eficiente para identificar as proteínas que interagem com MSH2 em *T. brucei*, ainda precisa ser otimizada para que possa ser possível detectar as proteínas com as quais MSH2 interage em *T. cruzi*.

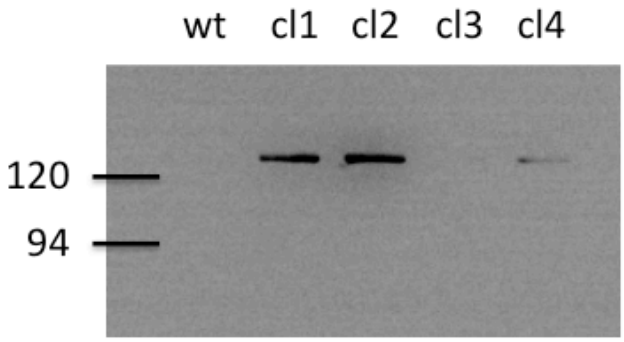


Figura 17: *Western blot* de formas epimastigotas de *T. cruzi* expressando MSH2 em fusão com *myc tag*. Extrato proteico total correspondente a $2x10^6$ parasitos de cultura de parasitos selvagem (wt) e quatro diferentes clones de parasitos transfectados para expressar MSH2:myc foi separado em gel de poliacrilamida 10% e transferido para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada em solução de bloqueio contendo 5% de leite com anti-*myc* (1:5000) por aproximadamente 16 horas e com anti-camundongo conjugado a peroxidase (1:7000) por 1 hora. A proteína MSH2::myc tem peso molecular predito de 124 kDa.

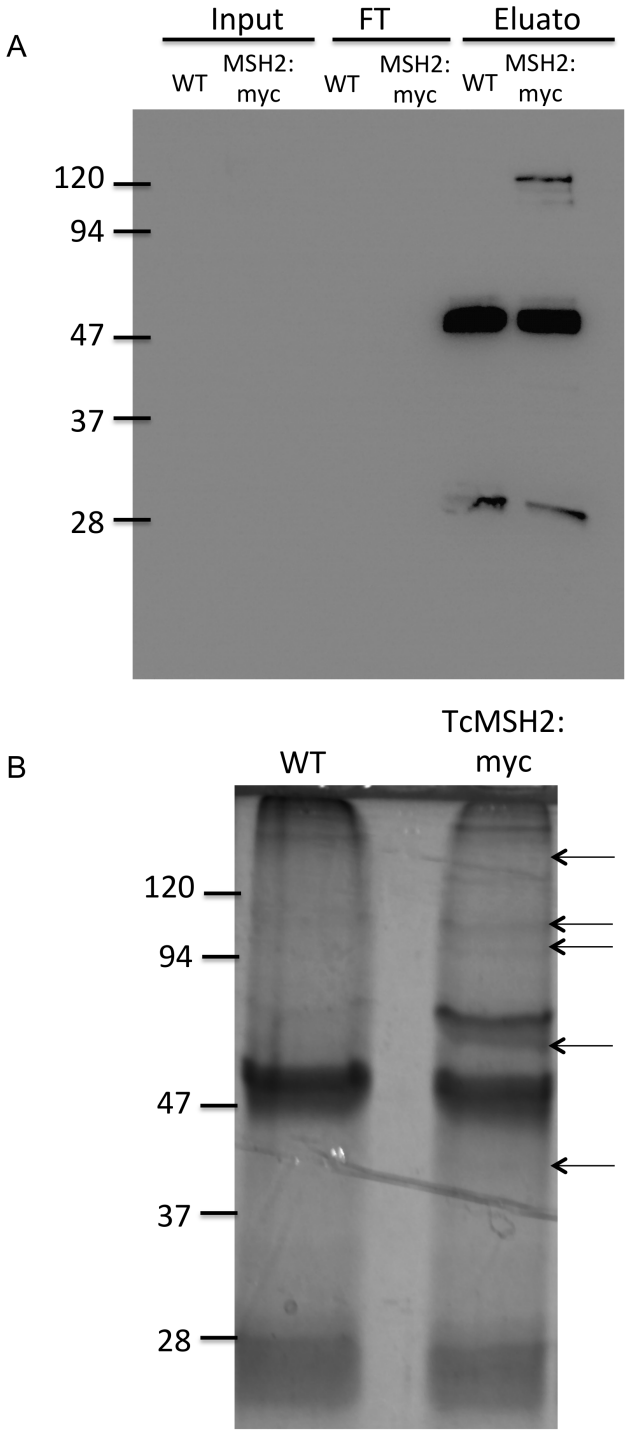


Figura 18: Co- imunoprecipitação de TcMSH2 fusionado a tag de myc. A) Parasitos expressando MSH2 com tag de myc e parasitos selvagens foram lisados e o extrato total dos parasitos incubados com anticorpo anti-myc. MSH2:myc tem o peso molecular esperado de 124 kDa e é detectada no extrato concentrado de proteínas eluídas. São observadas também as bandas correspondentes às cadeias leve e pesada do anticorpo anti-myc. **B)** Gel de poliacrilamida 10% corado com comassie coloidal do eluato concetrado de WT e TcMSH2:myc. As bandas excisadas na tentativa de identificação estão demonstradas com uma seta a direita**.**

4.9 – Localização subcelular de MSH2

Os dados obtidos até o momento sugerem o envolvimento da proteína MSH2 de *T. cruzi* e de *T. brucei* na resposta ao estresse oxidativo. A quantificação de lesões no DNA mostrou um aumento dessas lesões (8-oxoG) tanto no DNA nuclear quanto no DNA mitocondrial dos parasitos *msh2* nocaute quando comparado com parasitos selvagens. Considerando que a mitocôndria é a principal fonte de ROS intracelular (Menna-Barreto e De Castro, 2014), decidimos avaliar se MSH2 estaria envolvida no reparo de lesões oxidativas no DNA mitocondrial por meio da verificação da sua localização subcelular. Para isso, foram utilizados os parasitos expressando a proteína MSH2 em fusão com um *tag* de c-*myc* em *T. cruzi* e *T. brucei* (descritos no ítem 4.8). Conforme observado na **Figura 19A** MSH2 localiza-se no núcleo na forma epimastigota de *T. cruzi*. Esses experimentos de imunolocalização foram repetidos com parasitos tratados com H_2O_2 e cisplatina, entretanto nenhuma alteração na localização nuclear foi visualizada, ou seja, não foi observada uma localização mitocondrial de MSH2 em nenhumas das condições testadas até o momento. Após infectar células Vero com tripomastigotas metacíclicas derivadas das formas epimastigotas expressando MSH2:myc, observamos novamente que MSH2 se localiza no núcleo de formas amastigotas intracelulares (**Figura 19B**). Na **Figura 19C** é possível visualizar que na forma sanguínea de *T. brucei* expressando MSH2:myc MSH2 também se localiza exclusivamente no núcleo. A localização nuclear para MSH2 também pode ser visualizada na forma procíclica de *T. brucei* expressando MSH2:myc (**Anexo1 – Fig7**), além disso, nenhuma mudança na localização celular de MSH2 foi observada em *T. cruzi* ou *T. brucei* quando essas células foram submetidas a tratamento com diferentes agente genotóxicos (não mostrado).

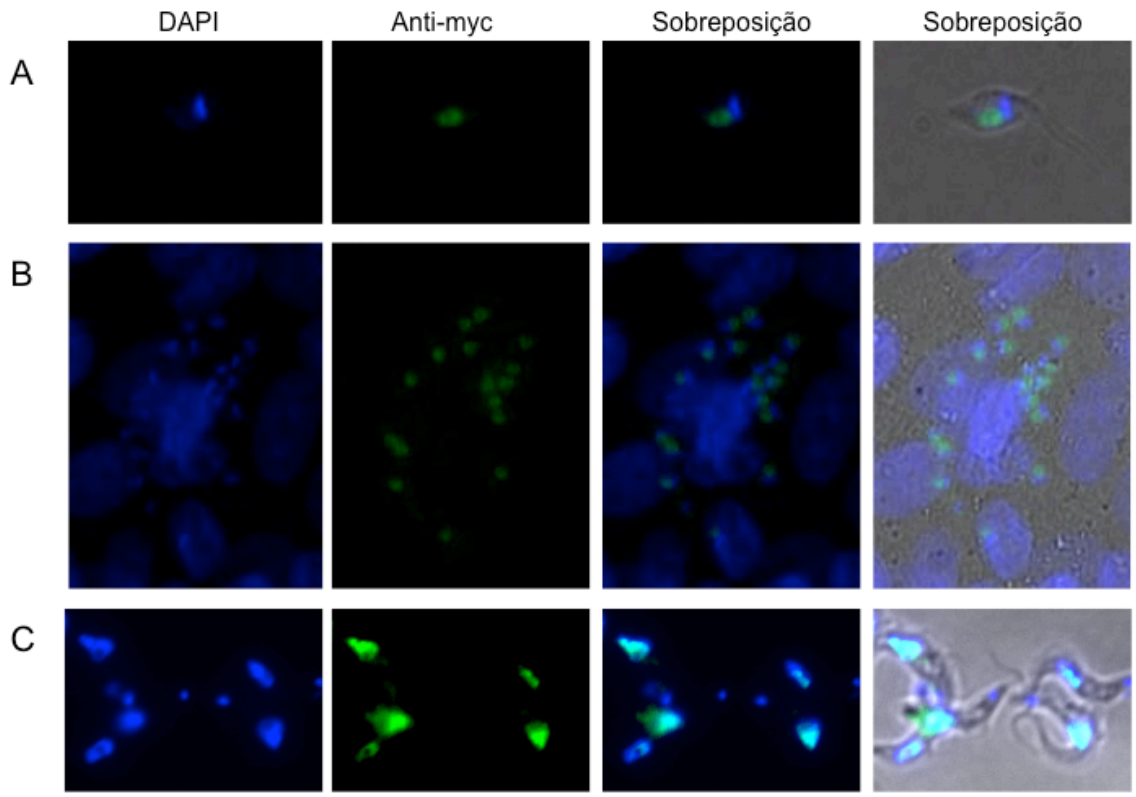


Figura 19: Localização celular de MSH2: Parasitos *T. cruzi* na forma epimastigota **(A),** amastigota **(B)** e *T. brucei* forma sanguínea **(C)** expressando MSH2 em fusão com tag de c-myc foram incubados com anticorpo anti-myc conjugado a Alexa 488 (1:500). O núcleo e o kDNA foram corados com DAPI. A localização subcelular foi observada em microscópio de fluorescencia.

4.10- Geração de nocautes para MSH6 em *T. cruzi*

Com o objetivo de avaliar o envolvimento de outras proteínas no MMR na resposta ao estresse oxidativo em *T. cruzi* foram gerados parasitos nocautes do gene *Tcmsh6. Tcmsh6* codifica MSH6, a proteína que forma dímeros com TcMSH2 para o reconhecimento de erros de pareamento e pequenas alças de inserção e deleção geradas durante a replicação do DNA. Para a geração de *T. cruzi msh6* heminocautes foi utilizada uma estratégia similar àquela utilizada na deleção do segundo alelo de *Tcmsh2*. A região codificadora de *Tcmsh6* foi interrompida pela construção HX1_Neo_GAPDH flanqueada por fragmentos das extremidades 5' e 3' da região codificadora (**Figura 20A**). Após a transfecção os parasitos foram selecionados com 200 μg/mL de G418. A população de parasitos resistentes a G418 foi clonada por plaqueamento em placas de ágar sangue e os clones obtidos foram analisados por PCR de colônia do DNA genômico (**Figura 20B**) e por *northern blot* (**Figura 20C**). Para avaliar a integração da construção utilizada no genoma de diferentes clones (representado aqui por apenas um) foram utilizados pares de iniciadores que anelam no genoma combinados a iniciadores que anelam na construção para o nocaute. No primeiro par de iniciadores, denominados como A, o iniciador direto anela na região 5' UTR acima da região homóloga que foi utilizada na recombinação (MSH6 5' KO – **Tabela 1**), enquanto o iniciador reverso anela no gene de resistência a neomicina (NeoRev – **Tabela1**). Apenas no gDNA extraído da cultura de parasitos nocautes é visualizado um fragmento de DNA correspondente a um amplicon de 1653 pares de bases. O segundo par de iniciadores, chamados como B (NeoFor e NeoRev – **Tabela 1**), amplifica a região correspondente ao gene de resistência Neomicina fosfotransferase. E somente na cultura de parasitos nocautes é observada a amplificação correspondente a um fragmento de 804 pares de base. O último par de iniciadores, chamados de C, amplifica toda a região codificadora de *msh6* (MSH6For e MSH6Rev –

Tabela 1). O alelo no qual *msh6* não foi deletado tem a sua ORF amplificada em um amplicon de 3.0 kb, enquanto que a interrupção da ORF pela construção para deleção amplifica um fragmento de 2.8 kb. A partir do gDNA de parasitos selvagens é amplificado um fragmento de 3.0 kb, por outro lado, nos clones de parasitos nos quais um dos alelos de *msh6* foi deletado são amplificadas dois fragmentos, um correspondente ao alelo não mutado e outro correspondente à ORF interrompida. Com o objetivo de verificar se a incorporação da construção para deleção de um dos alelos resulta na diminuição da expressão gênica, RNA total extraído de parasitos selvagem e heminocautes foram transferidos para membrana de nylon e hibridados com sonda formada por sequência parcial do gene *Tcmsh6* marcado com [α-^{32}P]-dCTP. É possível observar a redução na expressão do RNA de *Tcmsh6* em três diferentes clones de parasitos *Tcmsh6* +/-. Nenhuma alteração no crescimento celular foi observada nos parasitos *Tcmsh6* heminocautesa (não mostrado). A construção de vetores contendo sequências específicas para deleção do segundo alelo encontra-se em andamento.

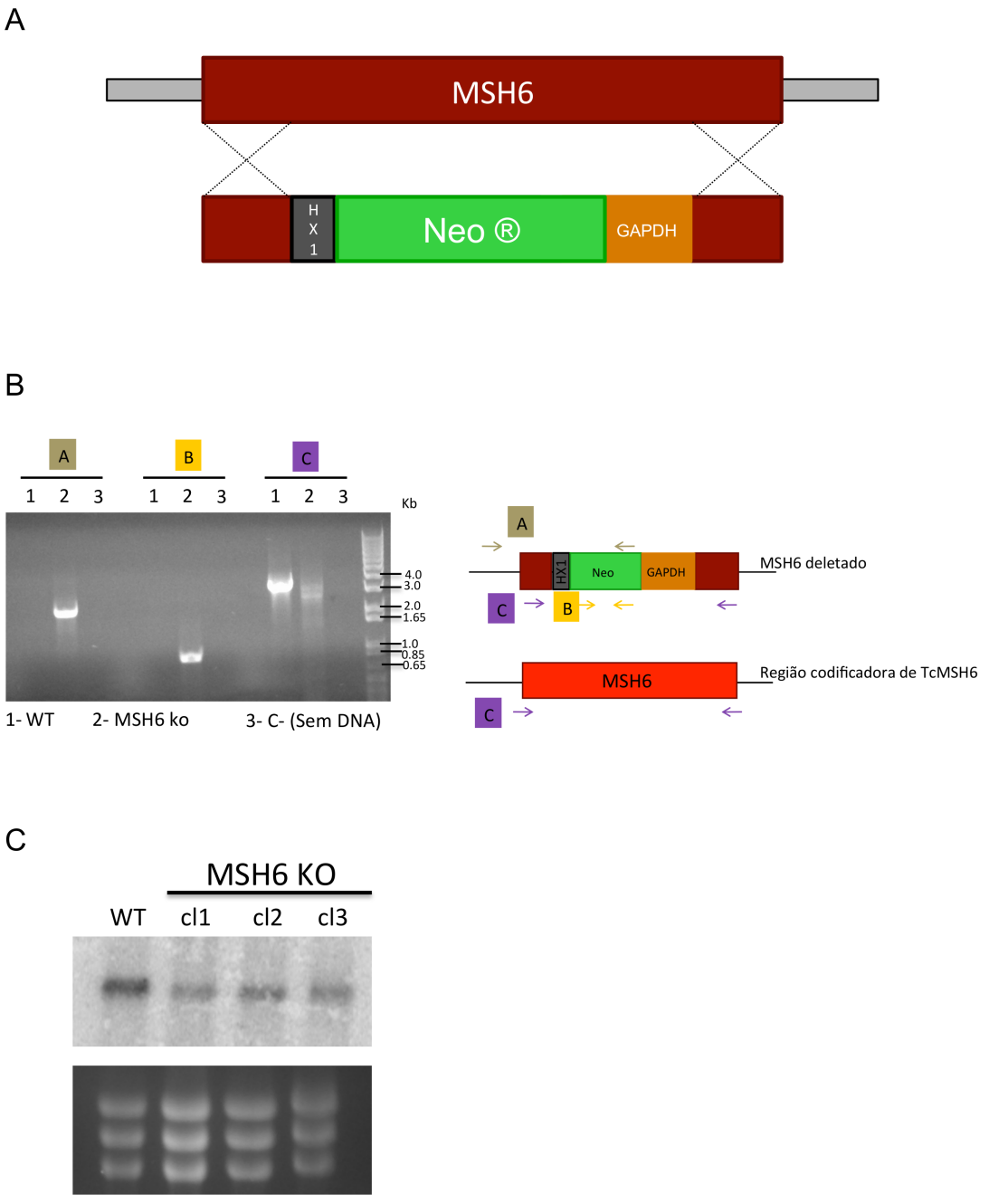


Figura 20: Análise de parasitos TcMSH6 heminocautes. A) A região codificadora de um dos alelos de *Tcmsh6* foi deletada por recombinação homóloga com a sequência de HX1_Neo_GAPDH flanqueada por pedaços da região codificadora. **B)** Os clones obtidos foram avaliados por PCR do DNA genômico. A posição de alinhamento dos iniciadores utilizados está representada à direita. O produto da amplificação foi visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **C)** Os clones selecionados foram avaliados também por *Northern Blot*. 20µg de RNA total de parasitos selvagem (WT) e três diferentes clones de *Tcmsh6* heminocuate (+/-) foram transferidos para membrana de nylon e hibridados com sonda formada por sequencia parcial do gene *Tcmsh6* marcado com [α-^{32}P]-dCTP.

4.11- Resposta de parasitos *Tcmsh6* nocautes a agentes genotóxicos

O efeito da deleção de um dos alelos de *Tcmsh6* foi testado em dois diferentes clones submetidos ao tratamento com 5 μM de MNNG. Como controle positivo e confirmando o resultado obtido anteriormente foi utilizado um clone de *Tcmsh2-/-*. Conforme observado na **Figura 21A**, a deleção de um dos alelos de *msh6* não resulta em maior tolerância ao MNNG, uma característica de células que apresentam o MMR deficiente.

Como citado anteriormente, existem evidências indicando que em fibroblastos humanos, o MSH6 atua juntamente com o MSH2 na resposta ao estresse oxidativo (Zlatanou *et al.*, 2011). Para investigar o envolvimento de TcMSH6 na resposta ao estresse oxidativo em *T. cruzi*, clones heminocautes para o gene e parasitos selvagem foram tratados com H_2O_2 por vinte minutos e depois recuperados em meio LIT por 48 horas (**Figura 21B**). Assim, como observado para os heminocautes de *Tcmsh2* os parasitos *Tcmsh6* heminocautes também apresentam maior sensibilidade ao H_2O_2 quando comparados à cultura de parasitos selvagem (WT), indicando que em *T. cruzi* esse componente do MMR também estaria envolvido na resposta ao estresse oxidativo.

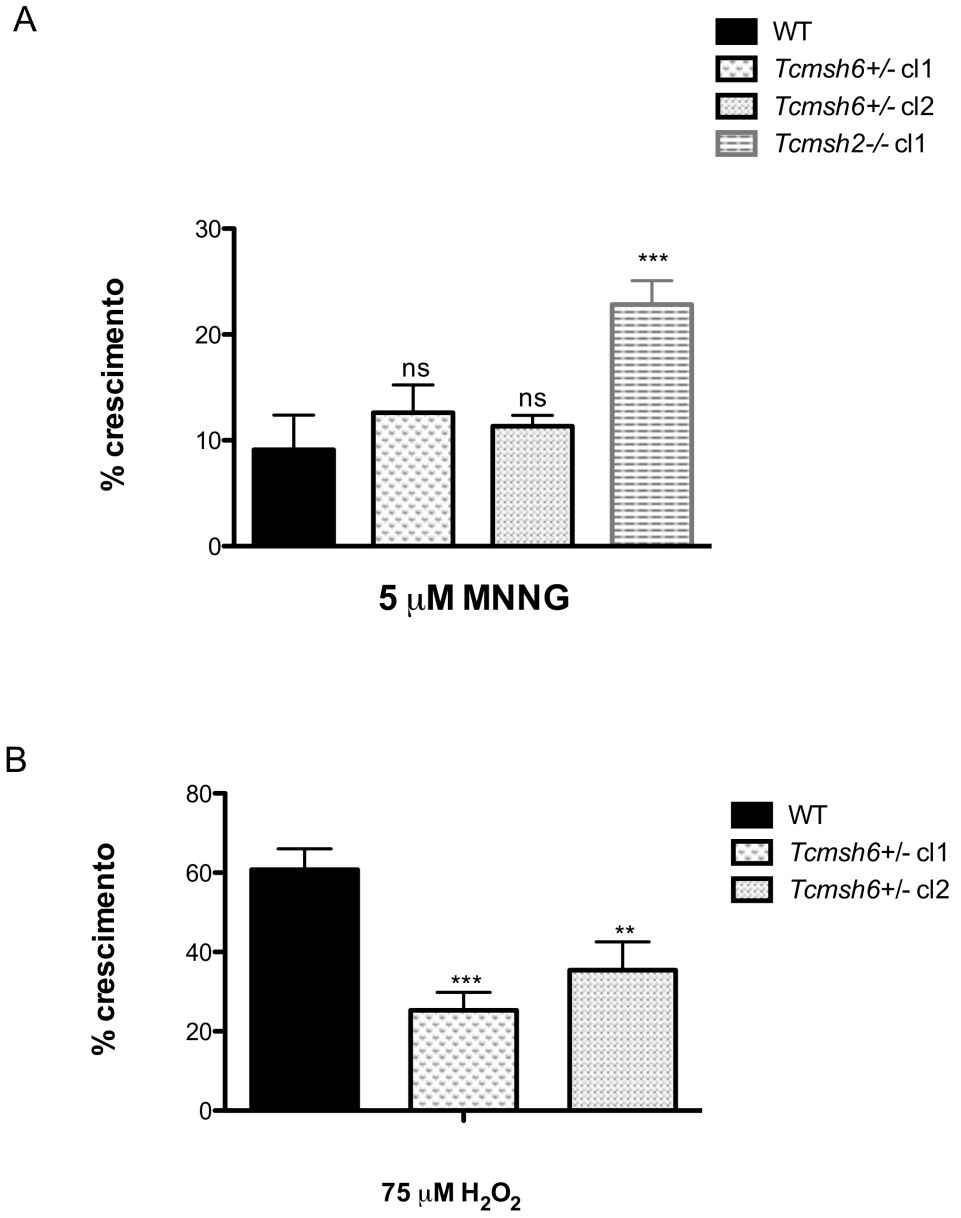
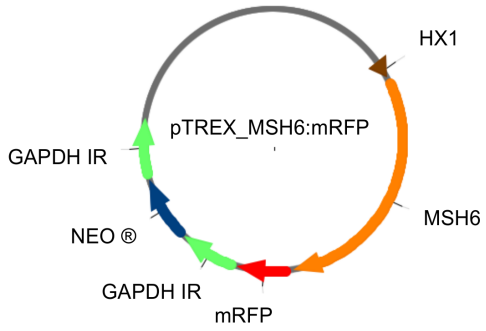


Figura 21: Tratamento de *T. cruzi msh6* heminocautes com agentes genotóxicos. A) Parasitos selvagem, dois diferentes clones apresentando um dos alelos de *msh6* deletados e um clone de parasito *msh2* nocaute foram tratados com 75 μM de MNNG por 72 horas e a porcentagem de crescimento calculada em relação à mesma cultura não tratada. **B)** Parasitos nos quais um dos alelos de *Tcmsh6* foi deletado e CL Brener selvagem foram tratados com H_2O_2 por 20 minutos. A porcentagem de parasitos sobreviventes foi determinada 48 horas após o tratamento. O símbolo de asterisco (*) refere-se à diferenças estatísticas significativas em relação ao controle WT (***P<0.001, **P<0.01, teste one-way ANOVA, seguido de teste Boferroni).

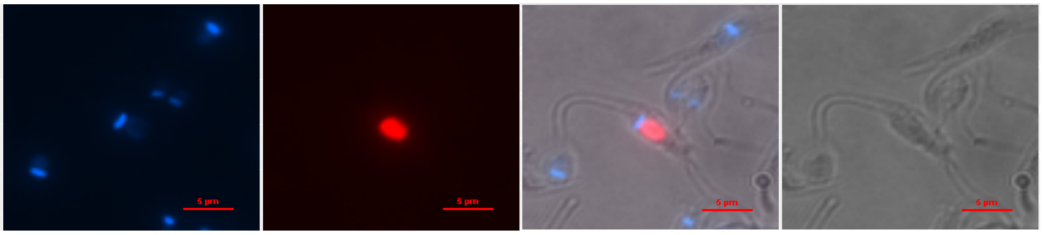
4.12- Localização de TcMSH6

Para investigar a localização de TcMSH6 em *T. cruzi* foram gerados parasitos nos quais MSH6 foi expressa em fusão com a proteína fluorescente vermelha (mRFP), por meio da transfeção de epimastigotas com o vetor pTREX_MSH6_mRFP na sua forma episomal. A expressão da proteína recombinante ocorre de forma transiente e foi observada 48 horas após a transfecção. Assim como o observado quando foi feita a expressão de MSH2 em fusão com *tag* de myc (**Figura 19**), a localização de TcMSH6 em fusão com mRFP mostrou-se nuclear, como esperado para proteínas de reparo de DNA (**Figura 22**). Entretanto, como a expressão ocorre de forma transiente, não é possível investigar se haveria alguma alteração na localização celular após exposição a diferentes agentes genotóxicos. Para essas análises, foram gerados também parasitos expressando MSH6 com *tag* de hemaglutinina (HA) de forma estável com uma construção para recombinação no *locus* de *msh6* como feito para *Tcmsh2* e *Tbmsh6*, em estratégia similar à esquematizada na **Figura 13**. Os parasitos expressando *Tcmsh6*:HA foram incubados com anticorpo anti-HA (Roche) 1:50 e anti-rato (Molecular Probes/ Life Technologies) 1:100 e visualizados por microscopia de fluorescência. Assim como observado para a expressão de MSH6 em fusão com mRFP, a expressão de TcMSH6 com *tag* de HA também identifica uma proteína nuclear. O DNA nuclear e kDNA são visualizados após coloração com DAPI (**Figura 22C**).

A



B



C

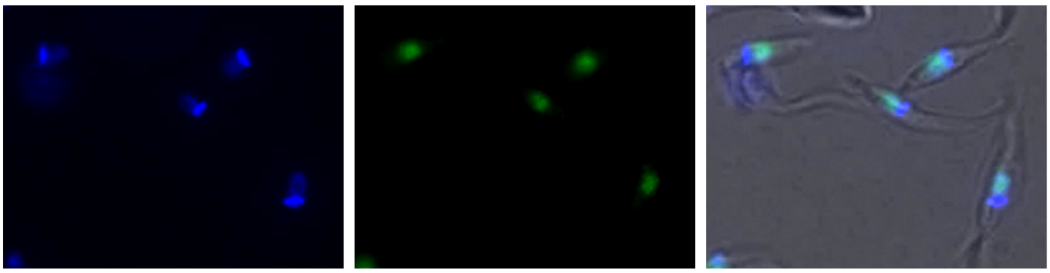


Figura 22: Localização subcelular de TcMSH6. A) A localização de TcMSH6 foi visualizada após a transfecção com pTREX_MSH6:mRFP em forma episomal. **B)** 48 horas após a transfecção os parasitos foram fixados, corados com DAPI e visualisados por microscopia de fluorescência. **C)** A localização de TcMSH6 foi visualizada também em parasitos expressand o MSH6 com *tag* de HA. Os parasitos fixados foram incubados com anticorpo anti-HA (1:50) e anti-rato conjugado a Alexa 488 (1:100).

5- Discussão

A identificação dos mecanismos e/ou vias moleculares e celulares essenciais para permitir o estabelecimento e manutenção de uma infecção, assim como a transmissão de patógenos infecciosos é muito importante para o desenvolvimento de novos alvos quimioterápicos e vacinas para controle de inúmeras doenças humanas. Nesse sentido as vias que atuam na manutenção da estabilidade e/ou replicação do genoma nuclear e mitocondrial podem ser consideradas vias essenciais, por determinarem todos os aspectos da biologia de um determinado patógeno. Em qualquer organismo, o balanço entre as taxas de mutação e de reparo leva ao equilíbrio entre instabilidade e estabilidade genômica e à consequente evolução adaptativa dos organismos (Elena e Lenski, 2003). A manutenção da estabilidade genômica é uma consequência direta dos mecanismos que asseguram a fidelidade da replicação e da eficiência dos diversos sistemas de reparo do DNA, a maioria dos quais é conservado em tripanosomatídeos (Passos-Silva *et al.*, 2010). As vias de reparo de DNA reconhecem e corrigem uma ampla gama de danos ou alterações aos ácidos nucléicos. E embora sejam essenciais, a maioria das vias de reparo de DNA são bem conservadas entre os eucariotos, o que limita o seu potencial como alvo de drogas. Entretanto, além de protegerem o genoma de mutações, as vias de reparo de DNA também atuam na adaptação de mecanismos de resistência a drogas, o que torna o seu estudo ainda mais relevante, principalmente em organismos patogênicos (Genois *et al.*, 2014).

Defeitos na via de Reparo de Erros de Pareamento (MMR) estão associados com o aumento na taxa de mutação e instabilidade de microsatélites em vários organismos, incluindo tripanosomas (Bell *et al.*, 2004). O MMR aumenta em ~100 vezes a fidelidade da replicação do DNA por prevenir a substituição de bases e/ou instabilidade de sequencias repetitivas que surgem principalmente como erros ou intermediários da replicação do DNA ou recombinação homóloga (Iyama e Wilson, 2013). A importância do MMR na geração

de variabilidade genética em *T. cruzi* foi sugerida por Campos e colaboradores (2011) ao observarem que cepas de *T. cruzi* pertencentes a duas linhagens diferentes apresentam susceptibilidade diferenciada ao tratamento com drogas que ativam a via do MMR. Ao contrário do *T. brucei* que possui um eficiente mecanismo de evasão do sistema imune baseado na troca de proteínas de superfície VSG (Glover, Alsford e Horn, 2013; Horn, 2014), a manutenção da infecção pelo *T. cruzi* está relacionada à sua estrutura populacional heterogênea. A grande variabilidade genética observada nas diferentes cepas do parasito está correlacionada à sua capacidade de infectar diferentes hospedeiros e tipos celulares, virulência, progressão da doença, resistência a drogas, etc (Perez, Lymbery e Thompson, 2014).

Além do seu papel como componente da via clássica do MMR, no presente trabalho propomos um papel adicional para a proteína MSH2, por meio de mecanismos não canônicos independentes da via do MMR, na resposta ao estresse oxidativo. Como mostra a **Figura 23**, MSH2 possui um papel na via clássica do MMR de correção de erros de pareamento e alças de inserção e deleção, o qual pode ser evidenciado pelo aumento da taxa de mutação e pela instabilidade de microssatélites em células que apresentam o MMR deficiente. O nosso trabalho mostrou evidencias que indicam que, em *T. cruzi* e em *T. brucei*, danos no DNA causados por estresse oxidativo resultam no envolvimento da proteína MSH2 a qual poderia reparar esse dano de forma independente de outras proteínas do MMR ou poderia atuar na sinalização celular, o que resultaria em uma resposta mais abrangente de adaptação da célula ao estresse oxidativo.

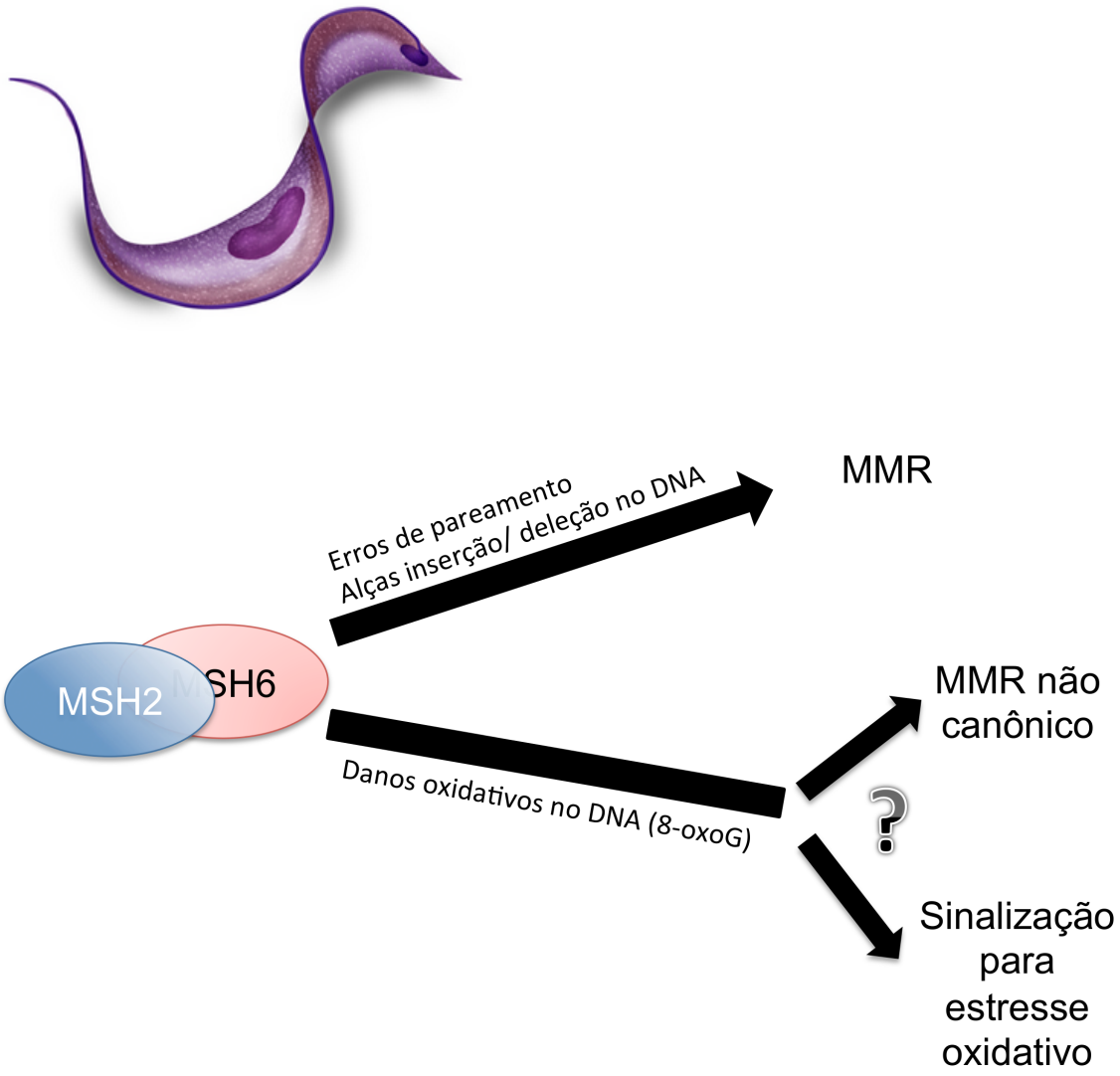


Figura 23: O MSH2 como moléculas sinalizadora de estresse oxidativo. De acordo com a hipótese aqui proposta, MSH2 possui um papel duplo, atuando no reparo de erros de pareamento (MMR) e também na reposta ao estresse oxidativo por uma via de reparo independente do MMR ou na sinalização do nível de danos oxidativos que pode culminar na morte celular. Essa sinalização pode ser devido ao reconhecimento de 8-oxoG no DNA.

Primeiramente, foi mostrado que é possível deletar o gene *msh2* em formas epimastigotas de *T. cruzi*, bem como nas formas procíclicas e tripomastigotas sanguíneas de *T. brucei*. Foi mostrado também ser possível gerar nocautes do gene *mlh1* em *T. brucei* e, até o momento, deletar um dos alelos de *msh6* em *T. cruzi*. A deleção de *msh2* em *T. cruzi* e nas formas sanguínea e procíclica de *T. brucei* resulta em dano na via do MMR, como demonstrado pelo aumento da tolerância ao MNNG, um fenótipo visto nos mutantes do MMR em outros eucariotos (Wyatt e Pittman, 2006). A ausência de um fenótipo frente ao tratamento com MNNG em *T. cruzi* com um dos alelos de *msh6* deletado sugere que apesar da diminuição da expressão da proteína, o MMR ainda é funcional nessas células. Além disso, uma diferença no fenótipo da perda de *msh2* pode ser observado nas diferentes fases do ciclo de vida do *T. brucei*: a ausência de MSH2 na forma sanguínea resulta em maior susceptibilidade ao H_2O_2, enquanto na forma procíclica resulta em tolerância aumentada ao H_2O_2. O mesmo fenótipo de tolerância pode ser observado nos mutantes de *msh2* na forma epimastigota de *T. cruzi*. Essa maior tolerância do *T. cruzi* parece ser mantida nas outras formas do ciclo de vida (tripomastigotas e amastigotas), pois foi observado um número maior de parasito mutantes no interior de macrófagos produtores de ROS. Uma evidência de que esse papel adicional de MSH2 na resposta ao estresse oxidativo, seja no reparo do dano ao DNA, seja como molécula sinalizadora ocorre de forma independente de outras proteínas do MMR, é a observação de que em *T. brucei* nocautes para MLH1 na forma sanguínea (Machado-Silva *et al.*, 2008) e na forma procíclica não apresentam alteração na resistência ao H_2O_2.

Embora o papel de MSH2 na via clássica do MMR, atuando no reparo de erros de pareamento e alças de inserção e deleção seja mais conhecido, existem evidências de que essa proteína também atua como sinalizador celular frente a diferentes lesões no DNA, como as lesões alquilantes resultado do tratamento com MNNG ou os adutos de bases

adjacentes na mesma fita ou entre fitas de DNA resultante da exposição à cisplatina (De Wind *et al.*, 1995; Fink, Zheng*, et al.*, 1997; Lin, Kim e Howell, 1999; Toft *et al.*, 1999; Lips e Kaina, 2001; Clodfelter, B Gentry e Drotschmann, 2005; Noonan *et al.*, 2012). No presente trabalho, propomos um novo papel para MSH2 também na sinalização de danos oxidativos no DNA, provavelmente pelo reconhecimento de 8-oxoG.

Embora o dímero MSH2-MSH6 seja capaz de reconhecer uma timina erroneamente pareada com O^6-meG, um dano decorrente do tratamento com MMNG, os ciclos fúteis de reparo na tentativa de eliminar o dano levam à sinalização celular para apoptose em células MMR-proficientes (Wyatt e Pittman, 2006). Em células de mamíferos o dímero MutSα, mas não MutSβ, é fundamental para a sinalização para iniciação da apoptose em resposta ao dano O^6-MeG de maneira independente de p53. Entretanto, o mecanismo pelo qual o reconhecimento de O^6-MeG sinaliza para apoptose ainda precisa ser elucidado (Hickman e Samson, 1999). Células com o MMR defectivo, devido à perda de proteínas do MMR sinalizando para a morte celular, tornam-se mais resistentes ao MNNG (Noonan *et al.*, 2012).

Outra forma pela qual o papel de MSH2 na sinalização celular após danos no DNA pode ser observado é após o tratamento com cisplatina. A cisplatina forma adutos no DNA e células que apresentam um MMR deficiente, inclusive células cancerosas, apresentam aumento na tolerância à cisplatina. Entretanto, o mecanismo pelo qual células MMR-defectivas promovem a tolerância à cisplatina ainda não está claro (Kothandapani *et al.*, 2013). Esse mecanismo de resistência pode ocorrer pela perda de sinalização apoptótica após o dano, pela perda de vias de reparo de DNA ou pela tolerância relacionada à alteração na expressão gênica de genes relacionados à parada do ciclo celular (Almeida *et al.*, 2008). Embora, os nocautes de MSH2 em *T. cruzi* respondam ao tratamento com MNNG com o aumento da resistência (**Figura 7B**), conforme o esperado para uma célula

com o MMR deficiente, o mesmo não foi observado para o tratamento com a droga cisplatina (**Figura 7C**), a qual os nocautes são mais susceptíveis. Até o momento, ensaios mostrando a resposta de parasitos *msh2* nocautes não foram realizados com o *T. brucei*. O mecanismo pelo qual os tripanosomatídeos respondem à cisplatina ainda não está claro. A existência de um mecanismo de *checkpoint* e ativação da apoptose nessas células ainda é controversa. Tripanosomatídeos não possuem caspase para ativação da via clássica da apoptose, embora evidencias indicando a existência de morte celular programada nesses organismos tenham sido descritas (Denninger *et al.*, 2007). Recentemente foi mostrado que em *T. cruzi* na presença de um inibidor de Topoisomerase I, os parasitos sinalizam para apoptose precoce, mas não tardia. Ou seja, os parasitos permanecem vivos em um estado semelhante à senescência (Zuma *et al.*, 2014). Em fibroblastos embrionários murinos e células cancerosas humanas foi sugerido que o BER e o MMR possam atuar juntos na resposta à cisplatina (Kothandapani *et al.*, 2013). Além disso, quando analisada a expressão de proteínas do NER em células tumorais resistentes à cisplatina foi observado que a grande maioria das linhagens resistentes apresenta diminuição na expressão de um ou mais componentes do NER (Bowden, 2014), sugerindo, portanto, que ocorra uma sobreposição das vias do BER, NER e MMR na resposta à cisplatina. Um estudo recente da via do NER em *T. brucei*, mostra que na ausência de alguns componentes da via as células se tornam mais sensíveis aos danos celulares induzidos pela cisplatina (Machado *et al.*, 2014). Esse dado juntamente com o dado aqui apresentado mostrando a susceptibilidade de clones *Tcmsh2* nocautes à cisplatina indica que em tripanosomatídeos pode não haver uma correlação entre a deficiência de uma via de reparo de DNA (MMR ou NER) com um aumento da tolerância à cisplatina, provavelmente porque o mecanismo de resposta das células à cisplatina está relacionado com a sinalização para morte celular e não ao reparo direto da lesão (Basu e Krishnamurthy, 2010). Ao contrário de outros

organismos eucariotos, a transcrição em tripanosomatídeos é policistrônica (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). Lesões que bloqueiam a transcrição, como o caso da cisplatina, podem levar à morte celular (Todd e Lippard, 2009).

Como discutido, a proteína MSH2 pode atuar, juntamente com a via do MMR, no reparo de erros de pareamento e alças de inserção e deleção, mas também na sinalização para morte celular após alguns danos no DNA causados por agentes genotóxicos como o MNNG e a cisplatina. Outro dano que pode ser gerado no DNA são os danos oxidativos. Esses danos não levam à parada da replicação celular, porém podem levar ao pareamento incorreto de bases com consequente aumento da mutagênese. O principal dano causado ao DNA por espécies reativas de oxigênio é a oxidação da guanina na posição 8 formando 8-oxoguanina (Wiseman e Halliwell, 1996).

O reconhecimento de 8-oxoG é mediado pelo dímero MSH2-MSH6 em células humanas (Zlatanou *et al.*, 2011), em *S. cerevisiae* (Ni, Marsischky e Kolodner, 1999) e em *E. coli* (Wyrzykowski e Volkert, 2003). O papel de MSH2-MSH6 no reparo de lesões oxidativas por uma via independente da via canônica do MMR foi sugerido após estudos em células de fibroblasto humano. O papel de MSH2-MSH6 não relacionado à via do MMR foi sugerido uma vez que em circunstâncias de danos oxidativo no DNA o reconhecimento da lesão por MSH2-MSH6 não recruta outras proteínas do MMR, ao invés disso, o reparo/tolerância é mediado pela ação do PCNA monoubiquitinado (mUb-PCNA) e Polη (Zlatanou *et al.*, 2011). A ubiquitinação do PCNA facilita o recrutamento de fatores para a síntese translesão (*error prone*) (Mailand, Gibbs-Seymour e Bekker-Jensen, 2013). MSH2-MSH6 promove a monoubiquitinação do PCNA logo após o estresse oxidativo de forma independente da via canônica do MMR. O mUb-PCNA e a Polη atuam de maneira coordenada com o heterodímero MSH2-MSH6 para remover lesões no DNA induzidas pelo estresse oxidativo em células humanas (Zlatanou *et al.*, 2011).

Já os estudos em *S. cerevisiae* sugerem que nessas células MSH2 juntamente com o MSH6 podem atuar no reparo de lesões oxidativas, mas também na sinalização celular. O erro de pareamento 8-oxoG:A, ocorrido devido a inserção de 8-oxoG durante a replicação, é um substrato para o MMR. O MMR é importante para prevenir a mutagênesis devido à guanina danificada (Shockley *et al.*, 2013). Embora MSH2-MSH6 seja eficiente na remoção de 8-oxoG, em situações de elevado estresse oxidativo o complexo formado por MSH2-MSH6 e 8-oxoG excede o nível basal e desencadeia um mecanismo de apoptose ao invés do reparo. Nesse caso, as proteínas da via de MMR funcionam como um sensor de dano no DNA e a sua ausência pode resultar na falha em ativar eficientemente mecanismos de morte celular em situações de alto estresse oxidativo (Ni, Marsischky e Kolodner, 1999).

Dados da literatura indicando um papel de MSH2 como molécula sinalizadora na resposta ao estresse oxidativo em células eucarióticas estão presentes em trabalhos que mostram uma avaliação da susceptibilidade de quatro sub-linhagens de carcinoma de cólon ao H_2O_2. Nesses trabalhos os autores observaram que, na ausência de p53, células MMR-deficientes são mais tolerantes aos danos provocados pelo H_2O_2. Por ouro lado, a ausência de p53 em células MMR-proficientes não altera de forma significativa a susceptibilidade ao H_2O_2 (Lin *et al.*, 2000). A hipótese de Lin e colaboradores (2000) propõe que p53 e o MMR atuam ao nível de reconhecimento de dano no DNA, ativação de *checkpoint* e em um ou mais pontos da sequência de eventos de sinalização que comunicam a presença de danos excessivos no DNA à maquinaria de apoptose.

A importância de uma via de reconhecimento de lesões oxidativas pode ser ainda maior em formas do ciclo de vida que estão mais susceptíveis a esse tipo de dano. Devido ao seu metabolismo baseado principalmente na degradação de aminoácidos e fosforilação oxidativa via cadeia transportadora de elétrons (Bringaud, Rivière e Coustou, 2006;

Gonçalves *et al.*, 2011), a forma epimastigota de *T. cruzi* e a forma procíclica do *T. brucei* apresentam um maior potencial de geração de ROS intracelular. Lembrando que a respiração mitocondrial é a maior fonte geradora de ROS em qualquer tipo celular, mesmo em condições fisiológicas (Menna-Barreto e De Castro, 2014).

A deleção de ambos os alelos de *msh2* na forma epimastigota de *T. cruzi* resulta em aumento da tolerância ao H_2O_2 (**Figura 8**), enquanto os estudos na forma procíclica de *T. brucei* mostram que a deleção de um ou ambos os alelos de *msh2* também resulta em aumento da tolerância ao H_2O_2 (Zeb, 2013). A deleção de *msh2* é acompanhada por um aumento de 8-oxoG tanto no nDNA quanto no kDNA da forma epimastigota de *T. cruzi* e procíclica de *T. brucei* em condições fisiológicas, ou seja, na ausência de tratamento que aumente a produção de ROS intracelular (**Figura 10**).

Em *T. brucei*, nocautes para MLH1 tanto na forma sanguínea (Machado-Silva *et al.*, 2008) quanto na forma procíclica (Zeb, 2013) não apresentam diferença de crescimento em relação ao parasito selvagem quando tratados com H_2O_2, além de não apresentarem diferenças em relação ao acúmulo de 8-oxoG (**Figura 10E**). A atuação do MLH1 em tripanosomatídeos parece ser diferente de outros eucariotos, uma vez que fibroblastos epiteliais humanos e embrionários murinos deficientes para a proteína MLH1 da via de MMR também apresentam resistência aumentada ao H_2O_2 quando comparadas a células não mutantes (Hardman, Afshari e Barrett, 2001). Esses dados juntamente com a observação de que a complementação de *Tbmsh2*-/- com o MSH2 de *T. cruzi* restaura a tolerância ao H_2O_2 em níveis similares ao WT, mas não complementa a função do MMR (Machado-Silva *et al*. 2008), sugerem que o papel sinalizador de MSH2 na resposta ao estresse oxidativo ocorre por via independente do MMR. Em *T. cruzi*, o aumento da susceptibilidade de parasitos com um dos alelos de *Tcmsh6* deletados ao H_2O_2 (**Figura 20**) sugere, no entanto, que a formação do dímero MSH2-MSH6 pode ser importante para o

reconhecimento de lesões (8-oxoG) ativando uma via de sinalização, independente de outros componentes do MMR. Em células humanas já foi demonstrado que a 8-oxoG é uma importante molécula sinalizadora. A OGG1 se liga a 8-oxoG livre com grande afinidade em um sítio independente do sítio catalítico de reconhecimento de lesões no DNA e esse complexo funciona com um potente ativador da família da Ras GTPase. Esse processo está relacionado à regulação de diferentes processos biológicos em células humanas como a polimerização de actina em músculo esquelético, homeostase, sistema imune, ativação de macrófagos e etc (Boldogh *et al.*, 2012; German *et al.*, 2013; Hajas *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2014; Aguilera-Aguirre *et al.*, 2015).

O papel de MSH2 na resposta ao estresse oxidativo também foi avaliada em outra forma do ciclo de vida do *T. cruzi*, uma vez que em *T. brucei* os nocautes de *msh2* na forma sanguínea são mais susceptíveis ao estresse oxidativo (Machado-Silva *et al.*, 2008), na forma procíclica eles são mais tolerantes (Zeb, 2013). Quando analisado a capacidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi* de invadirem e infectarem dois tipos celulares, nenhuma diferença é detectada quando parasitos WT e *Tcmsh2*-/- são utilizados na infecção de células Vero após 48 horas de infecção, entretanto 3x mais amastigotas são observadas no interior de macrófagos infectados com parasitos *Tcmsh2*-/-. Devido à sua natureza fagocítica, macrófagos produzem ROS pela ativação da NADPH oxidase durante a fagocitose ou pela estimulação com uma grande variedade de agentes infecciosos (Forman e Torres, 2002). Macrófagos intraperitoneais de camundongos BALB/c quando infectados com *Leishmania guyanensis* realizam explosão respiratória que culmina com a eliminação das amastigotas por via de apoptose, sem ativação exógena por LPS ou IFN-γ (Sousa-Franco *et al.*, 2006). Os danos oxidativos contribuem para a eliminação de patógenos durante a explosão respiratória, porém o papel de ROS na infecção por esses parasitos pode não ser tão simples. A forma tripomastigota infectante é mais resistente ao

estresse oxidativo gerado por macrófagos do que a forma epimastigota (Tanaka, Tanowitz e Bloom, 1983). Estudos recentes de Paiva e colaboradores (2012) sugerem que durante a infecção de macrófagos com *T.* cruzi, o estresse oxidativo gerado pela explosão respiratória poderia estimular a infecção, tendo o ROS um papel protetor. De acordo com essa hipótese, o estresse oxidativo aumenta o pool de ferro disponível no citoplasma, favorecendo o crescimento do parasito (Paiva *et al.*, 2012; Paiva e Bozza, 2014). O papel de ROS como molécula sinalizadora foi também descrito recentemente em estudos com *Leishmania* no qual foi mostrado que em baixas concentrações as moléculas de ROS atuam como potente sinal celular regulando a proliferação e diferenciação por modular a atividade de alvos celulares por oxidação. As mudanças na concentração intracelular de ferro ativam uma via de sinalização dependente de ROS que induz a diferenciação de promastigotas em amastigotas infectivas (Mittra e Andrews, 2013). Esses estudos mostram, portanto, que o ROS também tem um papel importante na manutenção da infecção desses patógenos e não só na sua eliminação conforme seria esperado. Essa hipótese está de acordo com nossos resultados que mostram um número similar de parasitos intracelulares das linhagens *Tcmsh2*-/- comparado aos parasitos WT quando a infecção é realizada em células Vero (**Figura 9**). Esse dado pode ser um reflexo da diferença de ambiente oxidativo encontrado nos diferentes tipos celulares e reforçam a hipótese de que os parasitos nocautes teriam maior capacidade de sobreviver em ambientes de maior estresse oxidativo. Ou seja, nenhuma diferença no crescimento celular é observada entre parasitos selvagem e *msh2* nocautes em condições de ausência ou somente de baixos níveis de estresse oxidativo. Se essa hipótese estiver correta é de se esperar que quando esses parasitos forem utilizados na infecção de macrófagos derivados de camundongos nocautes para NADPH oxidase, na ausência da produção de ROS, nenhuma diferença será observada para os nocautes de *msh2* e o parasito WT. A infecção de

macrófagos derivados de camundongos nocautes para NADPH oxidase será futuramente avaliada. Os dados de infecção de macrófagos juntamente com os dados obtidos após a exposição ao H_2O_2 sugerem que os nocautes de *msh2* tanto na forma epimastigota quanto na forma tripomastigotas e amastigota de *T. cruzi* são mais tolerantes a ambientes com aumento do estresse oxidativo.

O aumento de 8-oxoG também no kDNA após a deleção de *msh2* poderia sugerir que MSH2 atuasse no reparo dessas lesões também no DNA mitocôndrial. Em *T. cruzi* ou *T. brucei* não é encontrado nenhum ortólogo a MSH1, o qual em *S. cerevisiae* está relacionado ao reparo e estabilidade do DNA mitocondrial, principalmente em condições de estresse oxidativo (Reenan e Kolodner, 1992; Kaniak *et al.*, 2009). Entretanto, os dados mostrados acima de localização subcelular sugerem que MSH2 ou MSH6 nesses parasitos não teriam essa função. Apesar de nocautes para *msh2* mostrarem um aumento de 8-oxoG no núcleo e no kDNA não existem, pelo menos nas condições avaliadas, indícios de que MSH2 ou MSH6 possa se localizar na mitocôndria. Ao analisarmos as sequencias dos diferentes homólogos de MutS em *T. cruzi*, foi possível observar que a proteína MSH4 possui um sinal para localização mitocondrial no seu N-terminal, que não foi observada para MSH2 ou MSH6 (**Figura 24**). Esse sinal foi predito utilizando o software Mitoprot II com uma probabilidade de exportação para mitocôndria de 0.9726, enquanto a própria MSH1 de *S. cerevisiae* tem o sinal de exportação predito de 0.9903. MSH4 forma dímero com MSH5 e está envolvida na recombinação homóloga durante a meiose e não na via do MMR diretamente, entretanto as proteínas MSH4 e MSH5 humanas também podem estar envolvidas na resposta a danos no DNA (como por exemplo no reparo de quebra dupla de DNA durante a mitose) (Clark, Wu e Her, 2013). Embora nenhum estudo em outro organismo correlacione MSH4 à resposta ao estresse oxidativo ou localização mitocondrial, nenhum estudo em *T. cruzi* ou *T. brucei* verificou a função dessa proteína em

>TcCLB.509967.20 | Trypanosoma cruzi CL Brener Esmeraldo-like | mismatch repair protein MSH4, putative | CDS | length=3795

MNTCISVMVFFSLRWLFFSLARVFSPSPPIRQRPLRAYVERHIRVHIYLSVYIYIYRGNKESGEGGNPYGVLSCHV
TSEPPAHTLTPGRGGAPLSLMNLRPHRPGVRNSAPFISAAGASHNPHSPNGLQNEASFAFAVGEDPHHISSPWAGV
TTELGGRPVFAACPPFDRISQPVTPAAPLQRAGVIATDTTALLRMRTGATTSSAAKRSGASQGTGDCIVALIHNRA
NEVGVALCLFSSLAVIITQYGDSVAFAKTLSFVFSRNPVEVLVPETALDGNFVQTLLRHFRHITFTGVQRSTFDEA
RGAHRLFELMSTDEACLEVGNTDRYLCVAAANALVEFLEMNYNCTLLPHTVRVQYLALENYVEVSPIAARGLHLIS
SGPPPRAQSGGQRQDDAVGCGPKKRSARKTLFRGPREQRQSAPMLSLVDVLNHTMTIVGGRLLRSTILQPLRDPTS
IELRYDCVEWLRQEEETLKALRRSLQLLGNNDIERTVSNFSHEPKVQTLKTMQQRIEAVVTLWQLLGSATQLTTTL
SNCLREDEGALKDCEHGGPRSHDCCLSSDSGKYDVNEGDAYCSFRDEQPCPKRRRLDESCQSPQGVSPAHYHGVTA
EAPAVALRTHRGTNTLLCKILETLTECSMEEICAEIALHLDEGVLRATSGVGPQVGDGVTRRACRPSSAISQVQHC
FAVKPNISGTLDIARQQYSQAIEAIFALAEELKQRYSVWSLHVVYDGVRGYRFSYDARHERNAPDAVFLQKYSGGS
HDSLYHSSRMTMVGEEEKQTNTMEKSGGGGGGYGVGRAHAVATGSASPLRDEYFSTRQERFWPTYSHDAAALTPGE
QSGCNGEHQLTKHQVRGRRVACTTNELLVLCRNAEDAVAEIFYTQDGHVRFLIEYLRQRLGKLQAVCDAVALLDML
AAFAVYSRRNGCVRPKLLKPERPLVSGGGTYFLEARHIGGLATANSIQWGDDARVLLVTGPNAAGKTTILRQVGQL
FALAQIGCLVPAKAAAVRPCDRIIAHMLCDDLEDTTTSSFGKEMRELSYLCLHATQESVVLVDELGRRTSAREGAA
IAWATVEFLVETRCRSVFVTHFGPLTRLESRSAGAVKNYHLAVGTESDEEGGALGDATKTSGRPACTPRFEHRLIP
GPSLVDHYGLRLAERVGFFKPALDLAKELLPLMEGVRGAQQVGNTDHDAAAPEAEEVGRDERVEVLSDGRNRGEPG
ESGDAHDNASQPTEVSARLASATDLSSITAVSDESDITETMRNFYLNQ

Figura 24: Predição de sinal mitocondrial para TcMSH4. Sequencia de aminoácidos da proteína MSH4 foi utilizada para predição de sinalização celular. Em destaque está a sequencia de localização mitrocondrial predita pelo Mitoprot II. Estudos adicionais precisam ser realizados afim de elucidar o papel de MSH4 e MSH5 em *T. cruzi.*

tripanosomatídeos. Os dados de localização celular corroboram a hipótese de que MSH2 em tripanosomatídeos (e provavelmente também MSH6 em *T. cruzi*) atuam na resposta ao estresse oxidativo por um mecanismo de sinalização celular que pode ser fruto do reparo de DNA nuclear, mas não o reparo de DNA na mitocôndria. Considerando que um dos alvos de ROS é o DNA, com a formação de 8-oxoG (Wiseman e Halliwell, 1996) e que MSH2 está envolvido no reconhecimento de 8-oxoG, evidenciado pelo aumento de 8-oxoG em *T. cruzi* e *T. brucei* nocautes para *msh2* mas não para *mlh1* (**Figura 10**), pode-se especular que o reconhecimento de 8-oxoG pela proteína MSH2 seja o sinal intracelular que ative uma via não canônica de sinalização celular para responder ao estresse oxidativo.

Em fibroblastos humanos o reparo de lesões oxidativas por uma via não canônica do MMR está relacionada com o mUb-PCNA (Zlatanou *et al.*, 2011). A interação de MSH2-MSH6 com o PCNA é mediada por um motivo altamente conservado presente em MSH6, chamado PIP box: Q-x-x-[ILM]-x-x-[FY]-[FY] (Clark *et al.*, 2000; Kleczkowska *et al.*, 2001; Goellner *et al.*, 2014). Entretanto, não é encontrado nenhum motivo PIP box em MSH6 de *T. cruzi* e *T. brucei* quando analisadas as sequências de aminoácidos dessas proteínas ou em outras proteínas da via do MMR em tripanosomas. Embora não tenham sido identificados outros fatores que interagem com MSH2 em *T. cruzi* (**Figura 18**) e em *T. brucei* além das interações envolvidas na formação dos heterodímeros MutSα (MSH2-MSH6) e MutSβ (MSH2-MSH3) (**Figuras 16 e 17**), é possível especular que MSH2 em *T. cruzi* e *T. brucei* possa estar envolvido em um processo de sinalização celular que independe de PCNA. Existe a possibilidade de que as interações mais fracas ou que acontecem por um curto espaço de tempo não foram detectadas pela metodologia utilizada nesse estudo. Como alternativa poderá ser feito o *cross-linking* das proteínas antes da imunoprecipitação. Estudos adicionais em diferentes condições (por ex., após fixação das proteínas com formaldeído) e tratamento das células com H_2O_2 ainda serão realizados na

tentativa de identificar as proteínas que poderiam fazer parte de uma via não-canônica de resposta ao estresse oxidativo em tripanosomatídeos.

O *T. cruzi* possui ainda outras proteínas, além de MSH2 e MSH6, que podem estar envolvidas no reconhecimento e reparo de 8-oxoG, como OGG1, MutT e MutY (Passos-Silva *et al.*, 2010). Em camundongos deficientes para MTH1 (homólogo de MutT que degrada 8-oxodGTP do pool de nucleotídeos, prevenindo a incorporação no DNA), OGG1 (DNA glicosilase que excisa 8-oxoG do DNA) e MUTYH (DNA glicosilase homologa a MutY que remove adenina erroneamente incorporada pareando com 8-oxoG no DNA) foi demonstrado que o acúmulo de 8-oxoG causa mutações G para T em células da linhagem germinativa, o que aumenta a frequência de mutação na prole, sugerindo o papel dessas proteínas na remoção de 8-oxoG e prevenção de mutações (Ohno *et al.*, 2014).

Em *T. cruzi,* a glicosilase OGG1 é expressa no núcleo e mitocôndria e quando super-expressa os parasitos tornam-se mais sensíveis ao tratamento com H_2O_2 uma vez que a remoção da lesão é acompanhada do aumento de sítio abásicos AP, além de diminuírem os níveis de 8-oxoG no núcleo e mitocôndria após tratamento com H_2O_2 (Furtado *et al.*, 2012). Esse dado sugere, que diferente de células eucariotas, a proteína OGG1 de *T. cruzi* não teria papel de sinalizar o estresse oxidativo, o que pode estar relacionado com o papel da proteína MSH2 nos tripanosomatídeos.

O homólogo de MutY em *T. cruzi* é capaz de complementar bactéria deficiente em MutY e diminuir a sua taxa de mutação. Além disso, a proteína MutY recombinante é capaz de remover adenina erroneamente pareada com 8-oxoG *in vitro* (Kunrath-Lima, 2013). Da mesma forma verificada para proteína OGG1, células superexpressoras de MutY também são mais sensíveis ao tratamento com peroxido de hidrogênio.

T. cruzi expressa ainda um homólogo de MutT a qual degrada 8-oxodGTP do pool de nucleotídeos, prevenindo sua incorporação no DNA. A expressão heteróloga de MutT

bacteriano em *T. cruzi* resulta em maior tolerância dos parasitos ao estresse oxidativo gerado pelo H_2O_2, maior crescimento celular *in vitro* e *in vivo* (Aguiar *et al.*, 2013). Além disso, os dados obtidos com as células que superexpressam MutT sugerem que as mesmas têm uma maior capacide de sinalizar o estresse oxidativo, o que pode reforçar o papel da base 8-oxoG como sinalizador desse estresse.

A importância do MSH2 no reconhecimento das lesões de 8-oxoG no DNA também pode ser verificado no processo de resistência ao benzonidazol (BZ). O BZ é uma droga que tem o seu mecanismo de ação baseado na formação de radicais livres e metabólitos eletrofílicos (Rajão *et al.*, 2014). O tratamento com BZ é capaz de aumentar a quantidade de 8-oxoG presente no *pool* de nucleotídeos, o que faz com que células superexpressoras de MutT sejam mais resistentes a essa droga. Por outro lado, o BZ não é capaz de formar 8-oxoG em níveis importantes no DNA, uma vez que células superexpressoras de OGG1 e MutY não apresentam nenhum fenótipo relacionado ao tratamento com BZ. Entretanto, quando um dos alelos de *msh2* é deletado tem-se um aumento da resistência ao BZ, sugerindo que a 8-oxoG que não foi degradada pela MutT é incorporada ao DNA e reparada pelo MSH2 (Rajão *et al.*, 2014). Além disso, a Pol η de *T. cruzi*, assim como observado em fibroblastos (Zlatanou *et al.*, 2011), é capaz de realizar síntese translesão e incoporar nucleotídeos opostos à 8-oxoG (De Moura *et al.*, 2009).

Embora não se saiba qual seja o mecanismo de sinalização na resposta ao estresse oxidativo envolvendo MSH2, o presente trabalho sugere que na ausência de MSH2 os parasitos passam por um processo de adaptação e consequentemente tornam-se mais resistentes ao estresse oxidativo. Na forma epimastigota de *T. cruzi*, quando da diminuição a expressão de MSH2 resultante da deleção de um dos alelos (**Figura 6B**) têm-se um aumento da susceptibilidade ao H_2O_2 (**Figura 8** e Campos *et al*. 2011) e aumento de 8-oxoG tanto no nDNA quanto no kDNA (**Figura 9C** e Campos *et al*. 2011). De acordo com

a hipótese proposta, em parasitos *Tcmsh2*+/- a via de sinalização para o estresse oxidativo ainda estaria ativa, porém mais fraca devido à diminuição da expressão da proteína, o que resultaria em uma maior morte celular quando esses parasitos são expostos a uma condição de maior estresse oxidativo, como a gerada pelo tratamento com H_2O_2, ou seja, a proteína MSH2 que está sendo expressa tem a capacidade reduzida de sinalizar esse estresse oxidativo, levando as células a serem menos resistentes ao H_2O_2. O próprio H_2O_2 já foi demonstrado em outros tipos celulares como uma molécula sinalizadora reguladora de vários processos biológicos (Veal, Day e Morgan, 2007). A diminuição dessa sinalização somado à ausência do reparo via MSH2-MSH6, no entanto, torna os parasitos *Tcmsh2*+/- mais permissivos ao ROS intracelular com consequente acúmulo de 8-oxoG no núcleo e kDNA.

Podemos especular que um processo de adaptação ocorre nesses parasitos quando o segundo alelo de *msh2* é deletado, os quais perdem a capacidade de sinalizar o estresse oxidativo intracelular, via MSH2. Quando tratados com H_2O_2, parasitos *Tcmsh2*-/- mostraram-se mais resistentes ao tratamento (**Figura 8**). De maneira similar, na forma procíclica em *T. brucei* parasitos *Tbmsh2*-/- também são mais tolerantes aos danos oxidativos gerados pelo H_2O_2. A complementação dos nocautes com o gene de *msh2* na forma procíclica de *T. brucei* mostra que o fenótipo de resistência ao MNNG é revertido, sugerindo que a via do MMR está funcional, entretanto a susceptibilidade ao H_2O_2 não pôde ser revertida, sugerindo um mecanismo de adaptação dessas células para lidar com o estresse oxidativo, que não pôde ser revertido com a complementação (Zeb, 2013). O mesmo não é observado para a forma sanguínea de *T. brucei*, na qual parasitos *Tbmsh2*-/- são mais susceptíveis ao H_2O_2 e essa susceptibilidade é revertida quando esses parasitos são complementados com o gene *msh2* de *T. brucei* (Machado-Silva *et al.*, 2008).

Finzi e colaboradores (2004) observaram que a adaptação ao estresse oxidativo pode ser induzida em parasitos selvagens pré- tratados com doses sub-letais de H_2O_2 seguida por tratamento com doses letais de H_2O_2. No caso de parasitos pré tratados, esses se tornam mais resistentes ao tratamento com doses letais quando comparados aos parasitos que não foram pré-tratados (Finzi *et al.*, 2004). O aumento de ROS intracelular em células que possuem um metabolismo essencialmente aeróbico como a forma epimastigota em *T. cruzi* e a forma procíclica em *T. brucei* (Bringaud, Rivière e Coustou, 2006; Gonçalves *et al.*, 2011), em conjunto com a ausência de MSH2 para sinalizar esse aumento, pode estar como atuando de maneira similar ao pré-tratamento com doses sub-letais de H_2O_2. De forma que, quando expostos a altas concentrações de H_2O_2 os parasitos *Tcmsh2-/-* e *Tbmsh2-/-* fisiologicamente "pré- adaptados" ao ROS intracelular, gerado pelo seu próprio metabolismo, tornam-se mais resistentes ao H_2O_2.

Um processo de adaptação também poderia ter ocorrido na forma procíclica de *T. brucei*. Quando comparadas as formas sanguínea e procíclica de *T. brucei*, os nocautes de MSH2 na forma sanguínea são mais susceptíveis ao H_2O_2 (Machado-Silva *et al*. 2008), enquanto os nocautes em procíclico são mais tolerantes (Zeb, 2013). Devido ao próprio metabolismo dessas células, onde a forma sanguínea baseia-se principalmente na glicólise no interior do glicossomo e na produção de acetato no interior da mitocôndria sem fosforilação oxidativa para a obtenção de energia (Mazet *et al.*, 2013), enquanto a forma procíclica utiliza como fonte de energia glicose, L-prolina ou L-treonina e possui uma cadeia transportadora de elétrons funcional (Hannaert *et al.*, 2003; Bringaud, Rivière e Coustou, 2006), espera-se que a produção de ROS intracelular na forma procíclica seja naturalmente maior do que na forma sanguínea. Assim, com a deleção de ambos os alelos de *msh2* na forma sanguínea, e consequente perda de MSH2 sinalizando o dano oxidativo, ao serem expostos a situações de elevado estresse oxidativo, como no tratamento com

H_2O_2 os parasitos torna-se mais susceptíveis ao estresse oxidativo (Machado-Silva *et al.*, 2008). Entretanto, quando um alelo de *msh2* é deletado na forma procíclica, esses parasitos por já terem um metabolismo baseado na maior geração de ROS intracelular se adaptam e tornam-se mais resistentes ao estresse oxidativo gerado pelo tratamento com H_2O_2. Além disso, essas células acumulam mais 8-oxoG tanto no núcleo quanto no kDNA (**Figura 10 D** e **E**). O mecanismo pelo qual ocorre esse processo de adaptação quando um dos alelos de *msh2* na forma procíclica de *T. brucei* é deletado ainda não é conhecido. Quando o segundo alelo de *msh2* é deletado na forma procíclica tem-se a perda da sinalização de estresse oxidativo do MSH2 que ainda estava presente e consequentemente os parasitos se tornam um pouco mais sensíveis ao H_2O_2 em relação ao parasito *Tbmsh2*+/-. Apesar dos nocautes ainda acumularem 8-oxoG, esse aumento de sensibilidade é acompanhado por uma redução de 2 vezes na expressão da enzima fumarato redutase na isoforma glicosomal, numa tentativa dos parasitos de diminuírem a produção de ROS intracelular.

O metabolismo de fumarato é um processo chave no metabolismo aeróbico de parasitos, necessário para o crescimento e sobrevivência no hospedeiro. Ausente nas células de mamíferos do hospedeiro vertebrado, a Fumarato Redutase dependente de NADH catalisa a conversão de fumarato em succinato com formação de NAD^+ (Coustou *et al.*, 2005; Merlino *et al.*, 2014). Na **Figura 25** está representado o esquema do metabolismo aeróbico a partir da glicose ou L-prolina na forma procíclica de *T. brucei* com a geração de succinato como produto final excretado. Em bactérias anaeróbicas já foi observado que em condições aeróbicas de crescimento a fumarato redutase é uma fonte de espécies reativas de oxigênio. Além disso, o fumarato reduz a formação de ROS por competir com o oxigênio pelos elétrons do grupo flavina da FRD (Meehan e Malamy, 2012). O consumo de D-glicose é reduzido em 50% em linhagens de *T. brucei* mutantes para a forma glicosomal da fumarato redutase (FRDg) sem que ocorra alteração no

crescimento celular. Ou seja, os parasitos têm de adaptar o metabolismo glicosomal para manter o balanço NAD^+/ NADH (Coustou *et al.*, 2005). A diminuição na expressão de FRDg em parasitos *T. brucei msh2-/-* na forma procíclia pode ser um mecanismo de proteção dessas células contra a geração de ROS intracelular, uma vez que esses parasitos não possuem a proteína MSH2 que, de acordo com a nossa hipótese, está envolvida na sinalização de danos causados por ROS. Para investigar essa hipótese, estudos mais detalhados sobre as alterações no metabolismo desses parasitos, inclusive em relação à isoforma mitocôndrial de FRD, precisam ser realizados. Embora não existam muitos estudos sobre a função da FRD em *T. cruzi* essa enzima também é funcional no parasito e participa da redução do fumarato a succinato, como observado para a forma procíclica de *T. brucei*. A redução do oxigênio a H_2O_2 ao invés de H_2O dependente de NADH é inibida pelo fumarato, sugerindo que o H_2O_2 é em parte gerado pela enzima fumarato redutase (Denicola-Seoane *et al.*, 1992).

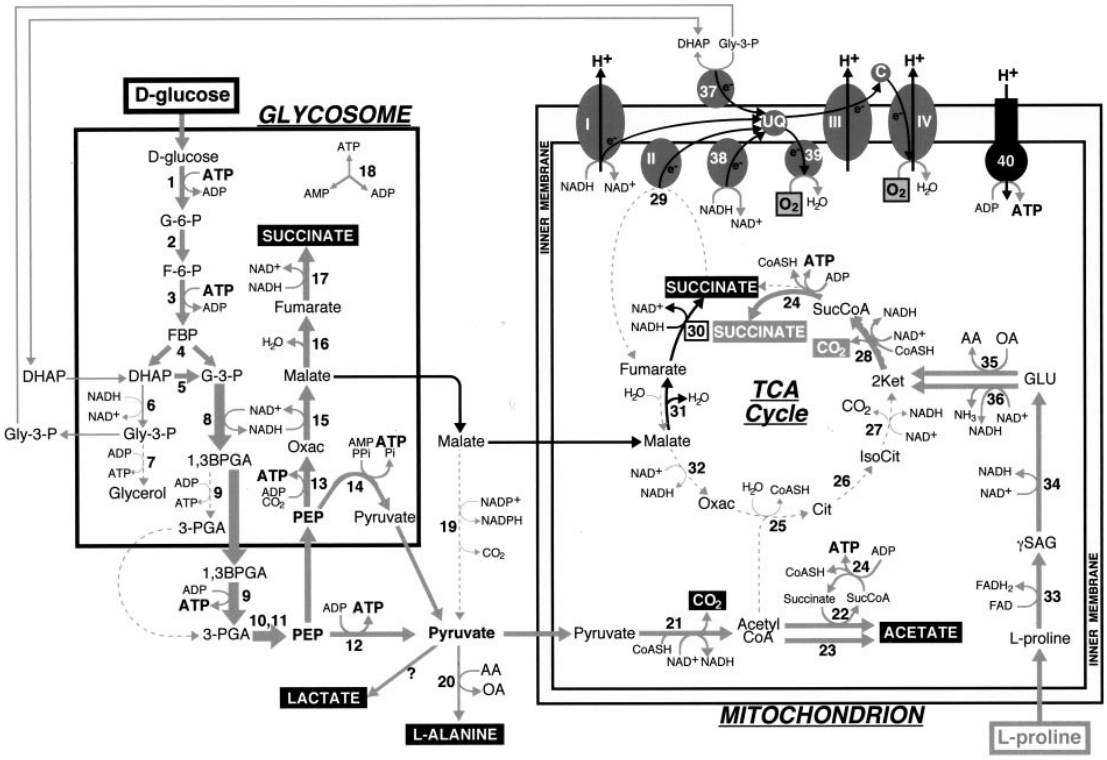


Figura 25: Metabolismo de D-glicose e L-prolina na forma procíclica de *T. brucei*. Os passos enzimáticos do metabolismo de D-glicose e L-prolina estão representados por setas cinzas, exceto para os passos que levam à produção de succinato derivado de glicose na mitocôdria, que estão representados por setas pretas. Os produtos excretados (acetato, L-alanina, lactato, succinato e CO_2) estão letras brancas e mercados com um fundo preto (quando derivados do metabolismo de D-glicose) ou com fundo cinza (quando derivados do metabolismo de L-prolina). O fluxo metabólico em cada passo enzimático é representado pela expessura da seta. As setas em linhas pontilhadas indicam fluxos que são muito baixos ou inexistentes em condições padrões de crescimento. Os compartimentos glicosomal e mitocôndrial e o ciclo do àcido tricarboxílico estão indicados. A enzima fumarato redutase responsável pela redução do fumarato a succinato está representada pelo número 17 no glicossomo e pelo número 30 na mitocôndria. Retirado de (Coustou *et al.*, 2005).

Embora os experimentos de RNAseq, PCR quantitativa do cDNA e *western blot* sugiram uma redução na expressão de FRDg na forma procíclica de *T. brucei*, essa alteração não foi observada em *T. cruzi*. O aumento aparente na expressão de FRD em *T. cruzi*, entretanto, não se mostrou estatisticamente significativo. Com o objetivo de verificar se enzimas sabidamente envolvidas no metabolismo de ROS poderiam ter a sua expressão alterada e assim contribuir para o mecanismo de resistência de parasitos *T. cruzi msh2* -/- na resposta ao estresse oxidativo, extratos de parasitos WT, *Tcmsh2*+/- e *Tcmsh2*-/- foram incubados com anticorpos anti- tripanotiona redutase e Fe-SOD A. Observou-se um aumento de Fe-SOD A nos parasitos MSH2 nocautes, sugerindo que na ausência de MSH2 ocorra um desbalanço na sinalização do estresse oxidativo intracelular, gerando mais H_2O_2 o qual também é um importante sinalizador na célula.

Em condições de elevado estresse oxidativo, a sobrevivência depende da habilidade da célula em adaptar e resistir ao estresse ou reparar e substituir as moléculas danificadas (Finkel e Holbrook, 2000). Embora ainda não seja conhecido o mecanismo de sinalização pelo qual MSH2 atua na resposta ao estresse oxidativo, fato é que ao longo do seu ciclo de vida, os parasitos estão susceptíveis a uma ampla gama de fontes de estresse, como a mudança de temperatura, disponibilidade de nutrientes, resposta imune do hospedeiro, estresse osmótico e estresse oxidativo. O sucesso da infecção depende da habilidade do parasito para se adaptar a essas condições de mudança de ambiente e hospedeiro. Falhas na capacidade de ativar os mecanismos de adaptação vão resultar na morte celular (Jimenez, 2014). Além disso, a estrutura populacional do *T. cruzi* é formada por diferentes cepas com grau variável de infectividade, virulência, tropismo tecidual e sensibilidade a drogas (Perez, Lymbery e Thompson, 2014). De acordo com os estudos de Campos e colaboradores (2011), quando cepas representantes do tipo *T. cruzi* I são avaliadas frente ao tratamento com H_2O_2, essas cepas são mais tolerantes ao H_2O_2 do que cepas

representantes do tipo *T. cruzi* II, as quais acumulam mais 8-oxoG no kDNA após o tratamento (Campos *et al.*, 2011). Esses dados sugerem que pode haver uma diferença também na eficiência de sinalização do estresse oxidativo mediada por MSH2 em cepas que expressam a isoforma A (*T. cruzi* I) em relação às cepas que expressam a isoforma B ou C (*T. cruzi* II e III). Será importante verificar, portanto, se a isoforma A teria uma maior eficiência na sinalização quando comparada a isoforma MSH2 B. Essa hipótese será futuramente avaliada pela complementação do nocaute *Tcmsh2-/-* com as diferentes isoformas (A, B e C) de TcMSH2. Para tal será necessário a construção de um vetor de expressão que possua como marcador de seleção um gene de resistência uma terceira droga diferente da utilizada na geração dos nocautes, como por exemplo, puromicina ou blasticidina. Esse processo encontra-se em andamento.

6- Conclusão

A geração de linhagens de *T. cruzi* com ambos os alelos de *Tcmsh2* deletados resulta em parasitos com maior capacidade de resistir ao estresse oxidativo gerado pelo tratamento com H_2O_2 e maior capacidade de sobreviver no ambiente altamente oxidante dentro de macrófagos infectados. Nocautes para *msh2* em formas epimastigotas de *T. cruzi* e na forma procíclica de *T. brucei* mostram ainda maior acúmulo de 8-oxoG no DNA nuclear e no kDNA, ao contrário do nocaute de *mlh1*, indicando que o papel de MSH2 na resposta ao estresse oxidativo independe de outros componentes de via do MMR. Parasitos com um dos alelos de *msh6* deletados apresentam maior susceptibilidade ao tratamento com H_2O_2, sugerindo que a formação do heterodímero MSH2-MSH6 é importante para a ativação da via de resposta ao estresse oxidativo. Além disso, MSH2 e MSH6 possuem localização nuclear apesar do acúmulo de 8-oxoG também no kDNA, evidenciando o papel dessas proteínas também na sinalização do estresse oxidativo e não só no reparo. Em conjunto nossos dados nos levam a propor que a proteína MSH2 em *T. cruzi* (e possivelmente MSH6) tem um papel na sinalização do estresse oxidativo, além do reparo de lesões oxidativas no DNA e que na ausência de MSH2 formas dos parasitos *T. cruzi* e *T. brucei* que são naturalmente mais expostas ao ROS (epimastigota e procíclico, respectivamente) adaptam-se para lidar com o estresse oxidativo.

7- Perspectivas

- Complementar os nocautes de *Tcmsh2*-/- com *Tcmsh2* contendo sequencias codificando as 3 isoformas de MSH2 presentes na população de *T. cruzi*;
- Analisar o proteoma e o transcriptoma, por meio de RNAseq, de *Tcmsh2*+/-, *Tcmsh2*-/- e *Tcmsh2*-/-/+;
- Gerar clones de parasitos nos quais ambos os alelos de *Tcmsh6* deletados e avaliar o fenótipo com relaçãoao tratamento com os agentes genotóxicos MNNG, cisplatina e H_2O_2.
- Identificar as proteínas com as quais MSH2 e MSH6 interagem em *T. cruzi* e em *T. brucei* por imunoprecipitação de parasitos expressando MSH2 e MSH6 com *tag* de c-myc ou HA;
- Avaliar a infecção de macrófagos e camundongos WT e nocautes para NADPH oxidase (incapazes de realizar explosão respiratória quando infectados com *T. cruzi* - (Paiva *et al.*, 2012)) com tripomastigotas de parasitos WT e *Tcmsh2-/-*;

8- Referências Bibliográficas

AGUIAR, P. H. et al. Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in Trypanosoma cruzi cell viability. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 7, n. 6, p. e2279, 2013. ISSN 1935-2735. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23785540 >.

AGUILERA-AGUIRRE, L. et al. Whole transcriptome analysis reveals an 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-driven DNA repair-dependent gene expression linked to essential biological processes. **Free Radic Biol Med**, Jan 2015. ISSN 1873-4596. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25614460 >.

ALIBU, V. P. et al. A doubly inducible system for RNA interference and rapid RNAi plasmid construction in Trypanosoma brucei. **Mol Biochem Parasitol,** v. 139, n. 1, p. 75-82, Jan 2005. ISSN 0166-6851. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15610821 >.

ALSFORD, S. et al. High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. **Genome Res,** v. 21, n. 6, p. 915-24, Jun 2011. ISSN 1549-5469. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21363968 >.

ARAÚJO, P. R. et al. Development of a dual reporter system to identify regulatory cis-acting elements in untranslated regions of Trypanosoma cruzi mRNAs. **Parasitol Int,** v. 60, n. 2, p. 161-9, Jun 2011. ISSN 1873-0329. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21277385 >.

ARAÚJO, P. R.; TEIXEIRA, S. M. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in Trypanosoma cruzi: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 106, n. 3, p. 257-66, May 2011. ISSN 1678-8060. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21655811 >.

ARIAS, D. G. et al. Redox metabolism in Trypanosoma cruzi: functional characterization of tryparedoxins revisited. **Free Radic Biol Med,** v. 63, p. 65-77, Oct 2013. ISSN 1873-4596. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23665397 >.

ATWOOD, J. A. et al. The Trypanosoma cruzi proteome. **Science,** v. 309, n. 5733, p. 473-6, Jul 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020736 >.

AUGUSTO-PINTO, L. et al. Molecular cloning and characterization of the DNA mismatch repair gene class 2 from the Trypanosoma cruzi. **Gene,** v. 272, n. 1-2, p. 323-33, Jul 2001. ISSN 0378-1119. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470539 >.

_____. Single-nucleotide polymorphisms of the Trypanosoma cruzi MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. **Genetics,** v. 164, n. 1, p. 117-26, May 2003. ISSN 0016-6731. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12750325 >.

BALMER, O. et al. Phylogeography and taxonomy of Trypanosoma brucei. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 5, n. 2, p. e961, 2011. ISSN 1935-2735. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21347445 >.

BASSO, B.; MARINI, V. Experimental Chagas disease. Innate immune response in Balb/c mice previously vaccinated with Trypanosoma rangeli. I. The macrophage shows immunological

memory: Reality or fiction? **Immunobiology,** v. 219, n. 4, p. 275-84, Apr 2014. ISSN 1878-3279. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24321621 >.

BASU, A.; KRISHNAMURTHY, S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. **J Nucleic Acids,** v. 2010, 2010. ISSN 2090-021X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811617 >.

BELL, J. S. et al. Characterization of components of the mismatch repair machinery in Trypanosoma brucei. **Mol Microbiol,** v. 51, n. 1, p. 159-73, Jan 2004. ISSN 0950-382X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14651619 >.

BELL, J. S.; MCCULLOCH, R. Mismatch repair regulates homologous recombination, but has little influence on antigenic variation, in Trypanosoma brucei. **J Biol Chem,** v. 278, n. 46, p. 45182-8, Nov 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12933800 >.

BELLINI, M. F. et al. Biologic and genetics aspects of chagas disease at endemic areas. **J Trop Med,** v. 2012, p. 357948, 2012. ISSN 1687-9694. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22529863 >.

BERNARDES, L. S.; ZANI, C. L.; CARVALHO, I. Trypanosomatidae diseases: from the current therapy to the efficacious role of trypanothione reductase in drug discovery. **Curr Med Chem,** v. 20, n. 21, p. 2673-96, 2013. ISSN 1875-533X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23410156 >.

BERRIMAN, M. et al. The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei. **Science,** v. 309, n. 5733, p. 416-22, Jul 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020726 >.

BOLDOGH, I. et al. Activation of ras signaling pathway by 8-oxoguanine DNA glycosylase bound to its excision product, 8-oxoguanine. **J Biol Chem,** v. 287, n. 25, p. 20769-73, Jun 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22568941 >.

BOWDEN, N. A. Nucleotide excision repair: why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy? **Cancer Lett,** v. 346, n. 2, p. 163-71, May 2014. ISSN 1872-7980. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24462818 >.

BRENER, Z. Biology of Trypanosoma cruzi. **Annu Rev Microbiol,** v. 27, p. 347-82, 1973. ISSN 0066-4227. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4201691 >.

BRIERLEY, D. J.; MARTIN, S. A. Oxidative stress and the DNA mismatch repair pathway. **Antioxid Redox Signal,** v. 18, n. 18, p. 2420-8, Jun 2013. ISSN 1557-7716. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23121537 >.

BRINGAUD, F.; RIVIÈRE, L.; COUSTOU, V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. **Mol Biochem Parasitol,** v. 149, n. 1, p. 1-9, Sep 2006. ISSN 0166-6851. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16682088 >.

CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURM, N. R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes Infect,** v. 5, n. 13, p. 1231-40, Nov 2003. ISSN 1286-4579. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14623019 >.

CAMPOS, P. C. et al. Trypanosoma cruzi MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response. **Mol Biochem Parasitol,** v. 176, n. 1,

p. 8-16, Mar 2011. ISSN 1872-9428. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21073906 >.

CERQUEIRA, G. C. et al. Sequence diversity and evolution of multigene families in Trypanosoma cruzi. **Mol Biochem Parasitol,** v. 157, n. 1, p. 65-72, Jan 2008. ISSN 0166-6851. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18023889 >.

CLAIJ, N.; TE RIELE, H. Msh2 deficiency does not contribute to cisplatin resistance in mouse embryonic stem cells. **Oncogene,** v. 23, n. 1, p. 260-6, Jan 2004. ISSN 0950-9232. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14712231 >.

CLARK, A. B. et al. Functional interaction of proliferating cell nuclear antigen with MSH2-MSH6 and MSH2-MSH3 complexes. **J Biol Chem,** v. 275, n. 47, p. 36498-501, Nov 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11005803 >.

CLARK, N.; WU, X.; HER, C. MutS Homologues hMSH4 and hMSH5: Genetic Variations, Functions, and Implications in Human Diseases. **Curr Genomics,** v. 14, n. 2, p. 81-90, Apr 2013. ISSN 1389-2029. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24082819 >.

CLAYTON, C. E. Genetic manipulation of kinetoplastida. **Parasitol Today,** v. 15, n. 9, p. 372-8, Sep 1999. ISSN 0169-4758. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10461166 >.

_____. Networks of gene expression regulation in Trypanosoma brucei. **Mol Biochem Parasitol,** v. 195, n. 2, p. 96-106, Jul 2014. ISSN 1872-9428. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24995711 >.

CLODFELTER, J. E.; B GENTRY, M.; DROTSCHMANN, K. MSH2 missense mutations alter cisplatin cytotoxicity and promote cisplatin-induced genome instability. **Nucleic Acids Res,** v. 33, n. 10, p. 3323-30, 2005. ISSN 1362-4962. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15947132 >.

COUGHLIN, B. C. et al. Amastin mRNA abundance in Trypanosoma cruzi is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. **J Biol Chem,** v. 275, n. 16, p. 12051-60, Apr 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766837 >.

COUSTOU, V. et al. A mitochondrial NADH-dependent fumarate reductase involved in the production of succinate excreted by procyclic Trypanosoma brucei. **J Biol Chem,** v. 280, n. 17, p. 16559-70, Apr 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15718239 >.

DA SILVA, R. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; TEIXEIRA, S. M. Control mechanisms of tubulin gene expression in Trypanosoma cruzi. **Int J Parasitol,** v. 36, n. 1, p. 87-96, Jan 2006. ISSN 0020-7519. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16233898 >.

DANIELS, J. P.; GULL, K.; WICKSTEAD, B. Cell biology of the trypanosome genome. **Microbiol Mol Biol Rev,** v. 74, n. 4, p. 552-69, Dec 2010. ISSN 1098-5557. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21119017 >.

DAROCHA, W. D. et al. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in Trypanosoma cruzi. **Mol Biochem Parasitol,** v. 133, n. 2, p. 175-86, Feb 2004. ISSN 0166-6851. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14698430 >.

_____. Expression of exogenous genes in Trypanosoma cruzi: improving vectors and electroporation protocols. **Parasitol Res,** v. 92, n. 2, p. 113-20, Jan 2004. ISSN 0932-0113. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14634799 >.

DAROUI, P. et al. Hydrogen peroxide induces topoisomerase I-mediated DNA damage and cell death. **J Biol Chem,** v. 279, n. 15, p. 14587-94, Apr 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14688260 >.

DE FREITAS, J. M. et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of Trypanosoma cruzi. **PLoS Pathog,** v. 2, n. 3, p. e24, Mar 2006. ISSN 1553-7374. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16609729 >.

DE MOURA, M. B. et al. Cloning and characterization of DNA polymerase eta from Trypanosoma cruzi: roles for translesion bypass of oxidative damage. **Environ Mol Mutagen,** v. 50, n. 5, p. 375-86, Jun 2009. ISSN 1098-2280. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19229999 >.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction. **Int J Cell Biol,** v. 2010, 2010. ISSN 1687-8884. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811486 >.

DE WIND, N. et al. Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. **Cell,** v. 82, n. 2, p. 321-30, Jul 1995. ISSN 0092-8674. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7628020 >.

DENICOLA-SEOANE, A. et al. Succinate-dependent metabolism in Trypanosoma cruzi epimastigotes. **Mol Biochem Parasitol,** v. 54, n. 1, p. 43-50, Aug 1992. ISSN 0166-6851. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1518531 >.

DENNINGER, V. et al. Differentiation and apoptosis in the sleeping sickness inducing parasite Trypanosoma brucei. p. 820-829, 2007.

DONELSON, J. E.; GARDNER, M. J.; EL-SAYED, N. M. More surprises from Kinetoplastida. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 96, n. 6, p. 2579-81, Mar 1999. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10077550 >.

DOS SANTOS, S. L. et al. The MASP family of Trypanosoma cruzi: changes in gene expression and antigenic profile during the acute phase of experimental infection. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 6, n. 8, p. e1779, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22905275 >.

DUFERNEZ, F. et al. The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in trypanosomatidae: characterization, subcellular localization, and phylogenetic origin in Trypanosoma brucei. **Free Radic Biol Med,** v. 40, n. 2, p. 210-25, Jan 2006. ISSN 0891-5849. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16413404 >.

EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease. **Science,** v. 309, n. 5733, p. 409-15, Jul 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020725 >.

_____. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science,** v. 309, n. 5733, p. 404-9, Jul 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020724 >.

ELENA, S. F.; LENSKI, R. E. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. **Nat Rev Genet,** v. 4, n. 6, p. 457-69, Jun 2003. ISSN 1471-0056 (Print)
1471-0056 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12776215 >.

ERIE, D. A.; WENINGER, K. R. Single molecule studies of DNA mismatch repair. **DNA Repair (Amst),** v. 20, p. 71-81, Aug 2014. ISSN 1568-7856. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24746644 >.

FINK, D. et al. Loss of DNA mismatch repair due to knockout of MSH2 or PMS2 results in resistance to cisplatin and carboplatin. **Int J Oncol,** v. 11, n. 3, p. 539-42, Sep 1997. ISSN 1019-6439. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21528244 >.

_____. In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair. **Cancer Res,** v. 57, n. 10, p. 1841-5, May 1997. ISSN 0008-5472. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9157971 >.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature,** v. 408, n. 6809, p. 239-47, Nov 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11089981 >.

FINZI, J. K. et al. Trypanosoma cruzi response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. **Mol Biochem Parasitol,** v. 133, n. 1, p. 37-43, Jan 2004. ISSN 0166-6851. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14668010 >.

FLOHÉ, L. The trypanothione system and its implications in the therapy of trypanosomatid diseases. **Int J Med Microbiol,** v. 302, n. 4-5, p. 216-20, Oct 2012. ISSN 1618-0607. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22889611 >.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. **Am J Respir Crit Care Med,** v. 166, n. 12 Pt 2, p. S4-8, Dec 2002. ISSN 1073-449X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12471082 >.

FURTADO, C. et al. Functional characterization of 8-oxoguanine DNA glycosylase of Trypanosoma cruzi. **PLoS One,** v. 7, n. 8, p. e42484, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22876325 >.

FÈVRE, E. M. et al. The burden of human African trypanosomiasis. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 2, n. 12, p. e333, 2008. ISSN 1935-2735. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19104653 >.

GADELHA, F. R. et al. Release of the cytosolic tryparedoxin peroxidase into the incubation medium and a different profile of cytosolic and mitochondrial peroxiredoxin expression in H2O2-treated Trypanosoma cruzi tissue culture-derived trypomastigotes. **Exp Parasitol,** v. 133, n. 3, p. 287-93, Mar 2013. ISSN 1090-2449. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23266485 >.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. **Oncogene,** v. 31, n. 15, p. 1869-83, Apr 2012. ISSN 1476-5594. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21892204 >.

GENOIS, M. M. et al. DNA repair pathways in trypanosomatids: from DNA repair to drug resistance. **Microbiol Mol Biol Rev,** v. 78, n. 1, p. 40-73, Mar 2014. ISSN 1098-5557. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24600040 >.

GERMAN, P. et al. Activation of cellular signaling by 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-initiated DNA base excision repair. **DNA Repair (Amst),** v. 12, n. 10, p. 856-63, Oct 2013. ISSN 1568-7856. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23890570 >.

GLOVER, L.; ALSFORD, S.; HORN, D. DNA break site at fragile subtelomeres determines probability and mechanism of antigenic variation in African trypanosomes. **PLoS Pathog,** v. 9, n. 3, p. e1003260, Mar 2013. ISSN 1553-7374. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555264 >.

GOELLNER, E. M. et al. PCNA and Msh2-Msh6 activate an Mlh1-Pms1 endonuclease pathway required for Exo1-independent mismatch repair. **Mol Cell,** v. 55, n. 2, p. 291-304, Jul 2014. ISSN 1097-4164. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24981171 >.

GOLIASNAIA, N. V.; TSVETKOVA, N. A. Mismatch repair. **Mol Biol (Mosk),** v. 40, n. 2, p. 211-23, 2006 Mar-Apr 2006. ISSN 0026-8984. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16637261 >.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, Z. et al. Metabolic control analysis of the Trypanosoma cruzi peroxide detoxification pathway identifies tryparedoxin as a suitable drug target. **Biochim Biophys Acta,** v. 1850, n. 2, p. 263-73, Feb 2015. ISSN 0006-3002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25450181 >.

GONÇALVES, R. L. et al. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. **J Bioenerg Biomembr,** v. 43, n. 6, p. 651-61, Dec 2011. ISSN 1573-6881. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22081211 >.

GRISARD, E. C. et al. Characterization of Trypanosoma rangeli strains isolated in Central and South America: an overview. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 94, n. 2, p. 203-9, 1999 Mar-Apr 1999. ISSN 0074-0276. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10224529 >.

HAANSTRA, J. R. et al. Control and regulation of gene expression: quantitative analysis of the expression of phosphoglycerate kinase in bloodstream form Trypanosoma brucei. **J Biol Chem,** v. 283, n. 5, p. 2495-507, Feb 2008. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17991737 >.

HAJAS, G. et al. 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1 links DNA repair to cellular signaling via the activation of the small GTPase Rac1. **Free Radic Biol Med,** v. 61, p. 384-94, Aug 2013. ISSN 1873-4596. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23612479 >.

HANNAERT, V. et al. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. **Kinetoplastid Biol Dis,** v. 2, n. 1, p. 11, Oct 2003. ISSN 1475-9292. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613499 >.

HARDMAN, R. A.; AFSHARI, C. A.; BARRETT, J. C. Involvement of mammalian MLH1 in the apoptotic response to peroxide-induced oxidative stress. **Cancer Res,** v. 61, n. 4, p. 1392-7, Feb 2001. ISSN 0008-5472. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245440 >.

HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; SCHWARTZ, D. A.; YANG, I. V. Chagasic cardiomyopathy, from acute to chronic: is this mediated by host susceptibility factors? **Trans R Soc Trop Med Hyg,** v.

106, n. 9, p. 521-7, Sep 2012. ISSN 1878-3503. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22819769 >.

HICKMAN, M. J.; SAMSON, L. D. Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 96, n. 19, p. 10764-9, Sep 1999. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10485900 >.

HILLER, C. et al. Cytosolic peroxidases protect the lysosome of bloodstream African trypanosomes from iron-mediated membrane damage. **PLoS Pathog,** v. 10, n. 4, p. e1004075, Apr 2014. ISSN 1553-7374. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24722489 >.

HORN, D. Antigenic variation in African trypanosomes. **Mol Biochem Parasitol,** v. 195, n. 2, p. 123-9, Jul 2014. ISSN 1872-9428. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24859277 >.

HOTEZ, P. J. et al. Chagas disease: "the new HIV/AIDS of the Americas". **PLoS Negl Trop Dis,** v. 6, n. 5, p. e1498, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666504 >.

IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. **Science,** v. 309, n. 5733, p. 436-42, Jul 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020728 >.

IYAMA, T.; WILSON, D. M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **DNA Repair (Amst),** v. 12, n. 8, p. 620-36, Aug 2013. ISSN 1568-7856. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23684800 >.

IYER, R. R. et al. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. **Chem Rev,** v. 106, n. 2, p. 302-23, Feb 2006. ISSN 0009-2665. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16464007 >.

JIMENEZ, V. Dealing with environmental challenges: mechanisms of adaptation in Trypanosoma cruzi. **Res Microbiol,** v. 165, n. 3, p. 155-65, Apr 2014. ISSN 1769-7123. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24508488 >.

JIRICNY, J. The multifaceted mismatch-repair system. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 7, n. 5, p. 335-46, May 2006. ISSN 1471-0072. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16612326 >.

JUNOP, M. S. et al. In vitro and in vivo studies of MutS, MutL and MutH mutants: correlation of mismatch repair and DNA recombination. **DNA Repair (Amst),** v. 2, n. 4, p. 387-405, Apr 2003. ISSN 1568-7864. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12606120 >.

KADYROV, F. A. et al. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. **Cell,** v. 126, n. 2, p. 297-308, Jul 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16873062 >.

KANIAK, A. et al. Msh1p counteracts oxidative lesion-induced instability of mtDNA and stimulates mitochondrial recombination in Saccharomyces cerevisiae. **DNA Repair (Amst),** v. 8, n. 3, p. 318-29, Mar 2009. ISSN 1568-7864. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19056520 >.

KLECZKOWSKA, H. E. et al. hMSH3 and hMSH6 interact with PCNA and colocalize with it to replication foci. **Genes Dev,** v. 15, n. 6, p. 724-36, Mar 2001. ISSN 0890-9369. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274057 >.

KOLEV, N. G.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. RNA interference in protozoan parasites: achievements and challenges. **Eukaryot Cell,** v. 10, n. 9, p. 1156-63, Sep 2011. ISSN 1535-9786. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21764910 >.

KOTHANDAPANI, A. et al. Epistatic role of base excision repair and mismatch repair pathways in mediating cisplatin cytotoxicity. **Nucleic Acids Res,** v. 41, n. 15, p. 7332-43, Aug 2013. ISSN 1362-4962. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23761438 >.

KUMAR, S.; ALI, M. R.; BAWA, S. Mini review on tricyclic compounds as an inhibitor of trypanothione reductase. **J Pharm Bioallied Sci,** v. 6, n. 4, p. 222-8, Oct 2014. ISSN 0976-4879. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25400403 >.

KUNRATH-LIMA, M. **O sistema GO em *Trypanosoma cruzi*: caracterização dos genes TcOGG1 e TcMYH**. 2013. (Mestrado). Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais

LI, G. M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **Cell Res,** v. 18, n. 1, p. 85-98, Jan 2008. ISSN 1748-7838. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18157157 >.

LIN, X.; KIM, H. K.; HOWELL, S. B. The role of DNA mismatch repair in cisplatin mutagenicity. **J Inorg Biochem,** v. 77, n. 1-2, p. 89-93, Oct 1999. ISSN 0162-0134. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10626359 >.

LIN, X. et al. p53 interacts with the DNA mismatch repair system to modulate the cytotoxicity and mutagenicity of hydrogen peroxide. **Mol Pharmacol,** v. 58, n. 6, p. 1222-9, Dec 2000. ISSN 0026-895X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11093757 >.

LIPS, J.; KAINA, B. Repair of O(6)-methylguanine is not affected by thymine base pairing and the presence of MMR proteins. **Mutat Res,** v. 487, n. 1-2, p. 59-66, Nov 2001. ISSN 0027-5107. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595409 >.

LUO, J. et al. 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1-mediated DNA repair is associated with Rho GTPase activation and α-smooth muscle actin polymerization. **Free Radic Biol Med,** v. 73, p. 430-8, Aug 2014. ISSN 1873-4596. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24681335 >.

LYE, L. F. et al. Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. **PLoS Pathog,** v. 6, n. 10, p. e1001161, 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21060810 >.

MACHADO, C. R. et al. DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. **Mutat Res,** v. 612, n. 1, p. 40-57, Jan 2006. ISSN 0027-5107. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16040270 >.

_____. Nucleotide excision repair in Trypanosoma brucei: specialization of transcription-coupled repair due to multigenic transcription. **Mol Microbiol,** v. 92, n. 4, p. 756-76, May 2014. ISSN 1365-2958. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24661334 >.

MACHADO-SILVA, A. et al. Mismatch repair in Trypanosoma brucei: heterologous expression of MSH2 from Trypanosoma cruzi provides new insights into the response to oxidative damage. **Gene,** v. 411, n. 1-2, p. 19-26, Mar 2008. ISSN 0378-1119. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18262734 >.

MAILAND, N.; GIBBS-SEYMOUR, I.; BEKKER-JENSEN, S. Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 14, n. 5, p. 269-82, May 2013. ISSN 1471-0080. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23594953 >.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S. et al. Gene expression in trypanosomatid parasites. **J Biomed Biotechnol,** v. 2010, p. 525241, 2010. ISSN 1110-7251. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20169133 >.

MAYA, J. D. et al. Key proteins in the polyamine-trypanothione pathway as drug targets against Trypanosoma cruzi. **Curr Med Chem,** v. 21, n. 15, p. 1757-71, 2014. ISSN 1875-533X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24251576 >.

MAYNARD, S. et al. Mitochondrial base excision repair assays. **Methods,** v. 51, n. 4, p. 416-25, Aug 2010. ISSN 1095-9130. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20188838 >.

MAZET, M. et al. Revisiting the central metabolism of the bloodstream forms of Trypanosoma brucei: production of acetate in the mitochondrion is essential for parasite viability. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 7, n. 12, p. e2587, 2013. ISSN 1935-2735. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24367711 >.

MEEHAN, B. M.; MALAMY, M. H. Fumarate reductase is a major contributor to the generation of reactive oxygen species in the anaerobe Bacteroides fragilis. **Microbiology,** v. 158, n. Pt 2, p. 539-46, Feb 2012. ISSN 1465-2080. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22075026 >.

MENNA-BARRETO, R. F.; DE CASTRO, S. L. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **Biomed Res Int,** v. 2014, p. 614014, 2014. ISSN 2314-6141. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24800243 >.

MERLINO, A. et al. Homology modeling of T. cruzi and L. major NADH-dependent fumarate reductases: ligand docking, molecular dynamics validation, and insights on their binding modes. **J Mol Graph Model,** v. 48, p. 47-59, Mar 2014. ISSN 1873-4243. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24370672 >.

MINNING, T. A. et al. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of Trypanosoma cruzi. **BMC Genomics,** v. 10, p. 370, 2009. ISSN 1471-2164. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19664227 >.

MITTRA, B.; ANDREWS, N. W. IRONy OF FATE: role of iron-mediated ROS in Leishmania differentiation. **Trends Parasitol,** v. 29, n. 10, p. 489-96, Oct 2013. ISSN 1471-5007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23948431 >.

NAULA, C.; PARSONS, M.; MOTTRAM, J. C. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and Leishmania. **Biochim Biophys Acta,** v. 1754, n. 1-2, p. 151-9, Dec 2005. ISSN 0006-3002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16198642 >.

NI, T. T.; MARSISCHKY, G. T.; KOLODNER, R. D. MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxo-guanine in S. cerevisiae. **Mol Cell,** v. 4, n. 3, p. 439-44, Sep 1999. ISSN 1097-2765. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10518225 >.

NOGUEIRA, F. B. et al. Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in Trypanosoma cruzi population with in vitro-induced resistance to benznidazole. **Acta Trop,** v. 100, n. 1-2, p. 119-32, Nov 2006. ISSN 0001-706X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17113553 >.

_____. The level of ascorbate peroxidase is enhanced in benznidazole-resistant populations of Trypanosoma cruzi and its expression is modulated by stress generated by hydrogen peroxide. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 107, n. 4, p. 494-502, Jun 2012. ISSN 1678-8060. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666860 >.

NOONAN, E. M. et al. O6-Methylguanine DNA lesions induce an intra-S-phase arrest from which cells exit into apoptosis governed by early and late multi-pathway signaling network activation. **Integr Biol (Camb),** v. 4, n. 10, p. 1237-55, Oct 2012. ISSN 1757-9708. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22892544 >.

NOZAKI, T.; CROSS, G. A. Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in Trypanosoma cruzi. **Mol Biochem Parasitol,** v. 75, n. 1, p. 55-67, Dec 1995. ISSN 0166-6851. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8720175 >.

OHNO, M. et al. 8-oxoguanine causes spontaneous de novo germline mutations in mice. **Sci Rep,** v. 4, p. 4689, 2014. ISSN 2045-2322. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24732879 >.

PAIVA, C. N.; BOZZA, M. T. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? **Antioxid Redox Signal,** v. 20, n. 6, p. 1000-37, Feb 2014. ISSN 1557-7716. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23992156 >.

PAIVA, C. N. et al. Oxidative stress fuels Trypanosoma cruzi infection in mice. **J Clin Invest,** v. 122, n. 7, p. 2531-42, Jul 2012. ISSN 1558-8238. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22728935 >.

PASSOS-SILVA, D. G. et al. Overview of DNA Repair in Trypanosoma cruzi, Trypanosoma brucei, and Leishmania major. **J Nucleic Acids,** v. 2010, p. 840768, 2010. ISSN 2090-021X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20976268 >.

PELOSO, E. F. et al. Tryparedoxin peroxidases and superoxide dismutases expression as well as ROS release are related to Trypanosoma cruzi epimastigotes growth phases. **Arch Biochem Biophys,** v. 520, n. 2, p. 117-22, Apr 2012. ISSN 1096-0384. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22425758 >.

_____. Role of Trypanosoma cruzi peroxiredoxins in mitochondrial bioenergetics. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes,** v. 43, n. 4, p. 491-424, 2011.

PENG, D. et al. CRISPR-Cas9-Mediated Single-Gene and Gene Family Disruption in Trypanosoma cruzi. **MBio,** v. 6, n. 1, 2014. ISSN 2150-7511. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25550322 >.

PEREZ, C. J.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. Chagas disease: the challenge of polyparasitism? **Trends Parasitol,** v. 30, n. 4, p. 176-82, Apr 2014. ISSN 1471-5007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24581558 >.

PIACENZA, L. et al. Fighting the oxidative assault: the Trypanosoma cruzi journey to infection. **Curr Opin Microbiol,** v. 12, n. 4, p. 415-21, Aug 2009. ISSN 1879-0364. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19616990 >.

_____. Peroxiredoxins play a major role in protecting Trypanosoma cruzi against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. **Biochem J,** v. 410, n. 2, p. 359-68, Mar 2008. ISSN 1470-8728. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17973627 >.

_____. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of Trypanosoma cruzi virulence. **Int J Parasitol,** v. 39, n. 13, p. 1455-64, Nov 2009. ISSN 1879-0135. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19505468 >.

PILLON, M. C.; MILLER, J. H.; GUARNÉ, A. The endonuclease domain of MutL interacts with the β sliding clamp. **DNA Repair (Amst),** v. 10, n. 1, p. 87-93, Jan 2011. ISSN 1568-7856. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050827 >.

POGORZALA, L.; MOOKERJEE, S.; SIA, E. A. Evidence that msh1p plays multiple roles in mitochondrial base excision repair. **Genetics,** v. 182, n. 3, p. 699-709, Jul 2009. ISSN 0016-6731. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19398768 >.

PREUßER, C.; JAÉ, N.; BINDEREIF, A. mRNA splicing in trypanosomes. **Int J Med Microbiol,** v. 302, n. 4-5, p. 221-4, Oct 2012. ISSN 1618-0607. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22964417 >.

RAJÃO, M. A. et al. Unveiling benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in Trypanosoma cruzi. **Environ Mol Mutagen,** v. 55, n. 4, p. 309-21, May 2014. ISSN 1098-2280. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24347026 >.

RAMÍREZ, J. D. et al. Multilocus PCR-RFLP profiling in Trypanosoma cruzi I highlights an intraspecific genetic variation pattern. **Infect Genet Evol,** v. 12, n. 8, p. 1743-50, Dec 2012. ISSN 1567-7257. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22824418 >.

REENAN, R. A.; KOLODNER, R. D. Characterization of insertion mutations in the Saccharomyces cerevisiae MSH1 and MSH2 genes: evidence for separate mitochondrial and nuclear functions. **Genetics,** v. 132, n. 4, p. 975-85, Dec 1992. ISSN 0016-6731. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1334021 >.

SCHOFIELD, M. J.; HSIEH, P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. **Annu Rev Microbiol,** v. 57, p. 579-608, 2003. ISSN 0066-4227. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14527292 >.

SHI, H.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. An unusual Dicer-like1 protein fuels the RNA interference pathway in Trypanosoma brucei. **RNA,** v. 12, n. 12, p. 2063-72, Dec 2006a. ISSN 1355-8382. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17053086 >.

_____. Functional replacement of Trypanosoma brucei Argonaute by the human slicer Argonaute2. **RNA,** v. 12, n. 6, p. 943-7, Jun 2006b. ISSN 1355-8382. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611939 >.

SHOCKLEY, A. H. et al. Oxidative damage and mutagenesis in Saccharomyces cerevisiae: genetic studies of pathways affecting replication fidelity of 8-oxoguanine. **Genetics,** v. 195, n. 2, p. 359-67, Oct 2013. ISSN 1943-2631. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23893481 >.

SIA, E. A. et al. Isolation and characterization of point mutations in mismatch repair genes that destabilize microsatellites in yeast. **Mol Cell Biol,** v. 21, n. 23, p. 8157-67, Dec 2001. ISSN 0270-7306. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11689704 >.

SIA, E. A.; KIRKPATRICK, D. T. The yeast MSH1 gene is not involved in DNA repair or recombination during meiosis. **DNA Repair (Amst),** v. 4, n. 2, p. 253-61, Feb 2005. ISSN 1568-7864. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15590333 >.

SIEGEL, T. N. et al. Gene expression in Trypanosoma brucei: lessons from high-throughput RNA sequencing. **Trends Parasitol,** v. 27, n. 10, p. 434-41, Oct 2011. ISSN 1471-5007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737348 >.

SIMPSON, L. et al. Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 97, n. 13, p. 6986-93, Jun 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10860961 >.

STOCO, P. H. et al. Genome of the avirulent human-infective trypanosome--Trypanosoma rangeli. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 8, n. 9, p. e3176, Sep 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25233456 >.

STRUTHERS, L. et al. Direct detection of 8-oxodeoxyguanosine and 8-oxoguanine by avidin and its analogues. **Anal Biochem,** v. 255, n. 1, p. 20-31, Jan 1998. ISSN 0003-2697. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9448838 >.

TANAKA, Y.; TANOWITZ, H.; BLOOM, B. R. Growth of Trypanosoma cruzi in a cloned macrophage cell line and in a variant defective in oxygen metabolism. **Infect Immun,** v. 41, n. 3, p. 1322-31, Sep 1983. ISSN 0019-9567. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6350185 >.

TEIXEIRA, S. M.; DAROCHA, W. D. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Genet Mol Res,** v. 2, n. 1, p. 148-58, 2003. ISSN 1676-5680. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12917811 >.

TEIXEIRA, S. M. et al. Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. **Genet Mol Biol,** v. 35, n. 1, p. 1-17, Jan 2012. ISSN 1678-4685. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22481868 >.

TEIXEIRA, S. M.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of Trypanosoma cruzi. **J Biol Chem,** v. 270, n. 38, p. 22586-94, Sep 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7673251 >.

TEMPERTON, N. J. et al. Overexpression of superoxide dismutase in Trypanosoma cruzi results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. **Mol Biochem Parasitol,** v. 96, n. 1-2, p. 167-76, Oct 1998. ISSN 0166-6851. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851615 >.

TIENGWE, C. et al. Identification of ORC1/CDC6-interacting factors in Trypanosoma brucei reveals critical features of origin recognition complex architecture. **PLoS One,** v. 7, n. 3, p. e32674, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22412905 >.

TODD, R. C.; LIPPARD, S. J. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. **Metallomics,** v. 1, n. 4, p. 280-91, 2009. ISSN 1756-591X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20046924 >.

TOFT, N. J. et al. Msh2 status modulates both apoptosis and mutation frequency in the murine small intestine. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 96, n. 7, p. 3911-5, Mar 1999. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10097137 >.

TURRENS, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Mol Aspects Med,** v. 25, n. 1-2, p. 211-20, 2004 Feb-Apr 2004. ISSN 0098-2997. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15051329 >.

VANHAMME, L.; PAYS, E. Control of gene expression in trypanosomes. **Microbiol Rev,** v. 59, n. 2, p. 223-40, Jun 1995. ISSN 0146-0749. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7603410 >.

VAZQUEZ, M. P.; LEVIN, M. J. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved Trypanosoma cruzi expression vector. **Gene,** v. 239, n. 2, p. 217-25, Nov 1999. ISSN 0378-1119. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10548722 >.

VEAL, E. A.; DAY, A. M.; MORGAN, B. A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. **Mol Cell,** v. 26, n. 1, p. 1-14, Apr 2007. ISSN 1097-2765. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17434122 >.

WALKER, D. M. et al. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cell Mol Life Sci,** v. 71, n. 7, p. 1245-63, Apr 2014. ISSN 1420-9071. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24221133 >.

WILKINSON, S. R. et al. The Trypanosoma cruzi enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. **J Biol Chem,** v. 277, n. 19, p. 17062-71, May 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11842085 >.

_____. Trypanosoma cruzi expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 99, n. 21, p. 13453-8, Oct 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12351682 >.

_____. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in Trypanosoma cruzi. **J Biol Chem,** v. 275, n. 11, p. 8220-5, Mar 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10713147 >.

WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochem J,** v. 313 (Pt 1), p. 17-29, Jan 1996. ISSN 0264-6021. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8546679 >.

WYATT, M. D.; PITTMAN, D. L. Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. **Chem Res Toxicol,** v. 19, n. 12, p. 1580-94, Dec 2006. ISSN 0893-228X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17173371 >.

WYRZYKOWSKI, J.; VOLKERT, M. R. The Escherichia coli methyl-directed mismatch repair system repairs base pairs containing oxidative lesions. **J Bacteriol,** v. 185, n. 5, p. 1701-4, Mar 2003. ISSN 0021-9193. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12591888 >.

XU, D. et al. Evaluation of high efficiency gene knockout strategies for Trypanosoma cruzi. **BMC Microbiol,** v. 9, p. 90, 2009. ISSN 1471-2180. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19432966 >.

ZEB, T. F. **Mismatch repair in *T. brucei*: roles in protection against oxidative damage** 2013. (PhD). Parasitology, University of Glasgow

ZINGALES, B. et al. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 104, n. 7, p. 1051-4, Nov 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20027478 >.

_____. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **Int J Parasitol,** v. 28, n. 1, p. 105-12, Jan 1998. ISSN 0020-7519. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9504338 >.

ZLATANOU, A. et al. The hMsh2-hMsh6 complex acts in concert with monoubiquitinated PCNA and Pol η in response to oxidative DNA damage in human cells. **Mol Cell,** v. 43, n. 4, p. 649-62, Aug 2011. ISSN 1097-4164. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21855803 >.

ZUMA, A. A. et al. How Trypanosoma cruzi handles cell cycle arrest promoted by camptothecin, a topoisomerase I inhibitor. **Mol Biochem Parasitol,** v. 193, n. 2, p. 93-100, Feb 2014. ISSN 1872-9428. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24530483 >.

Anexo 1

PLOS | NEGLECTED TROPICAL DISEASES

RESEARCH ARTICLE

Distinct Phenotypes Caused by Mutation of *MSH2* in Trypanosome Insect and Mammalian Life Cycle Forms Are Associated with Parasite Adaptation to Oxidative Stress

Viviane Grazielle-Silva[1,2☯], Tehseen Fatima Zeb[2☯], Jason Bolderson[2], Priscila C. Campos[1], Julia B. Miranda[1], Ceres L. Alves[1], Carlos R. Machado[1], Richard McCulloch[2‡*], Santuza M. R. Teixeira[1‡*]

1 Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** The Wellcome Trust Center for Molecular Parasitology, Institute of Infection, Immunity and Inflammation, University of Glasgow, Glasgow, Scotland, United Kingdom

☯ These authors contributed equally to this work.
‡ RM and SMRT also contributed equally to this work.
* Richard.mcculloch@glasgow.ac.uk (RM); santuzat@ufmg.br (SMRT)

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Grazielle-Silva V, Zeb TF, Bolderson J, Campos PC, Miranda JB, Alves CL, et al. (2015) Distinct Phenotypes Caused by Mutation of *MSH2* in Trypanosome Insect and Mammalian Life Cycle Forms Are Associated with Parasite Adaptation to Oxidative Stress. PLoS Negl Trop Dis 9(6): e0003870. doi:10.1371/journal.pntd.0003870

Editor: Alvaro Acosta-Serrano, Liverpool School of Tropical Medicine, UNITED KINGDOM

Received: February 5, 2015

Accepted: June 2, 2015

Published: June 17, 2015

Copyright: © 2015 Grazielle-Silva et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: VGS was supported by a fellowship from CNPq [141073/2011-0] and a fellowship from Capes [8320/12-8] to work in the lab of RM, where the research was supported by the Wellcome Trust [083485] and the BBSRC [BB/K006495/1]. The Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology is supported by core funding from the Wellcome Trust [085349]. Work in SMRT's lab is supported by grants from CNPq [305314/2013-0] and FAPEMIG

Abstract

Background

DNA repair mechanisms are crucial for maintenance of the genome in all organisms, including parasites where successful infection is dependent both on genomic stability and sequence variation. MSH2 is an early acting, central component of the Mismatch Repair (MMR) pathway, which is responsible for the recognition and correction of base mismatches that occur during DNA replication and recombination. In addition, recent evidence suggests that MSH2 might also play an important, but poorly understood, role in responding to oxidative damage in both African and American trypanosomes.

Methodology/Principal Findings

To investigate the involvement of MMR in the oxidative stress response, null mutants of *MSH2* were generated in *Trypanosoma brucei* procyclic forms and in *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. Unexpectedly, the *MSH2* null mutants showed increased resistance to H_2O_2 exposure when compared with wild type cells, a phenotype distinct from the previously observed increased sensitivity of *T. brucei* bloodstream forms *MSH2* mutants. Complementation studies indicated that the increased oxidative resistance of procyclic *T. brucei* was due to adaptation to MSH2 loss. In both parasites, loss of MSH2 was shown to result in increased tolerance to alkylation by MNNG and increased accumulation of 8-oxo-guanine in the nuclear and mitochondrial genomes, indicating impaired MMR. In *T. cruzi*, loss of MSH2 also increases the parasite capacity to survive within host macrophages.

[APQ-04132-10]. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusions/Significance

Taken together, these results indicate MSH2 displays conserved, dual roles in MMR and in the response to oxidative stress. Loss of the latter function results in life cycle dependent differences in phenotypic outcomes in *T. brucei MSH2* mutants, most likely because of the greater burden of oxidative stress in the insect stage of the parasite.

Author Summary

Trypanosoma brucei and *Trypanosoma cruzi* are protozoa parasites that cause sleeping sickness and Chagas disease, respectively, two neglected tropical diseases endemic in sub-Saharan Africa and Latin America. The high genetic diversity found in the *T. cruzi* population and the highly diverse repertoire of surface glycoprotein genes found in *T. brucei* are crucial factors that ensure a successful infection in their hosts. Besides responding to host immune responses, these parasites must deal with various sources of oxidative stress that can cause DNA damage. Thus, by determining the right balance between genomic stability and genetic variation, DNA repair pathways have a big impact in the ability of these parasites to maintain infection. This study is focused on the role of a DNA mismatch repair (MMR) protein named MSH2 in protecting these parasites' DNA against oxidative assault. Using knock-out mutants, we showed that, besides acting in the MMR pathway as a key protein that recognizes and repairs base mismatches, insertions or deletions that can occur after DNA replication, MSH2 has an additional role in the oxidative stress response. Importantly, this extra role of MSH2 seems to be independent of other MMR components and dependent on the parasite developmental stage.

Introduction

Two members of the trypanosomatidae family, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*, are important human pathogens, since they cause, respectively, Chagas disease, or American trypanosomiasis, and African Sleeping Sickness, or Human African trypanosomiasis. Together, *T. cruzi* and *T. brucei* infections affect almost 20 million people [1, 2]. The life cycles of both these parasites involve two hosts: an invertebrate vector and a mammalian host. In the digestive tract of the insect vector *T. cruzi* multiplies as epimastigotes and differentiates into metacyclic trypomastigotes, which are expelled with the vector's faeces. After a blood meal, trypomastigotes injected in the host bloodstream can invade different cell types, where they replicate as intracellular amastigotes that, after a number of replication cycles in the host cell cytoplasm, differentiate into trypomastigotes and lyse the host cell membrane. Despite being similar in general strategy, the life cycle of *T. brucei* is different to that of *T. cruzi* in several key details. Notably, *T. brucei* does not display any intracellular replicative stages. In the mammal, *T. brucei* is exclusively extracellular, replicating in the bloodstream and tissue fluids as bloodstream form (BSF) cells, which can be taken up by the tsetse fly vector during a bloodmeal. In the insect vector BSF cells differentiate into replicative procyclic forms (PCF), which then undergo several further differentiation events associated with migration to the fly salivary glands, where non-replicative metacyclic trypomastigotes are formed and can be passed into a new mammalian host through the proboscis when the infected fly is feeding [3]. Irrespective of the detailed differences in the life cycles, differentiation between the mammal-infective and vector-infective

forms of both *T. cruzi* and *T. brucei* is accompanied by dramatic metabolic changes and morphological alterations [4].

The ability to multiply and survive inside a host or vector is crucial for the maintenance of a parasite infection and transmission, allowing continuation of the life cycle. As for any cell, unicellular parasites are exposed to potentially deleterious events during cell division. The by-products of cellular metabolism, allied to routine errors during DNA replication or recombination processes, represent endogenous sources of potential DNA damage and genome change. In addition, all organisms are subjected to exogenous genotoxic agents from the environment or, in the case of parasites, derived from host. In the mammalian host, *T. cruzi* invades non-phagocytic cells or can be internalized by macrophages by a phagocytosis-like process [5]. Inside macrophages *T. cruzi* triggers the activation of NADPH oxidase, which generates large amounts of reactive oxygen species (ROS) such as $O_2^{\bullet -}$. Moreover, pro-inflammatory cytokines triggered by *T. cruzi* infection also stimulate infected macrophages to produce high amounts of nitric oxide ($^{\bullet}NO$) through the induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS), which can react with $O_2^{\bullet -}$ producing peroxynitrite ($ONOO^-$), a powerful oxidant and cytotoxic molecule [6, 7]. Similarly, the insect life forms of both parasites must also deal with the invertebrate oxidative stress response generated against the parasite. Upon challenge with *T. brucei* the tsetse fly activates iNOS, generating $^{\bullet}NO$, and increases the levels of ROS such as hydrogen peroxide (H_2O_2) [8, 9]. To deal with all of these potentially genome damaging agents, trypanosomes, like any other organism, possess multiple DNA repair pathways [10, 11], though little work has detailed to what extent these pathways are needed in different parasite life cycle stages. One such DNA repair pathway is Mismatch Repair (MMR), which acts to detect and correct mispaired bases that escape the proofreading activity of DNA polymerases during replication or occur during recombination between non-identical DNA molecules. In eukaryotic cells, even small distortions in DNA caused by single-base mismatches or insertion/ deletion loops (IDLs) of 1–3 bases are recognised by the "sliding clamp" heterodimer formed by MSH2 and MSH6 proteins, which moves along DNA searching for errors [12]. Larger IDLs are recognised by a distinct heterodimer, composed of MSH2 and MSH3. Eukaryotes encode several further MSH proteins, all of which are homologous to bacterial MutS proteins, though many have adopted non-MMR roles [13]. Following mismatch recognition, an ATP-dependent conformation change in MSH2-6 or MSH2-3 promotes interaction with heterodimeric homologues of bacterial MutL proteins, bringing these factors to the site of the lesion. The excision step is catalyzed by an endonuclease activity within the MutL-related heterodimer formed between MLH1-PMS1 [14], and that activity is activated by PCNA (a component of replication machinery) [15] [16]. A defect in or directed inactivation of the MMR pathway leads to a 100–1000 fold increase in spontaneous mutation rate in all organisms examined, including *Escherichia coli* [17], *Saccharomyces cerevisiae* [18], *Caenorhabditis elegans* [19, 20], and *T. brucei* [21]. In human cells and murine models MMR deficiency is correlated with predisposition to cancer [22, 23]. MMR suppresses mutations by increasing DNA replication fidelity through preventing base substitutions or repeat sequence instability, events that can also occur during homologous recombination [24].

In addition to repair of non-identical DNA sequences, MMR has also been demonstrated to be involved in the response to DNA damage induced by genotoxic agents, among them the alkylator N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), the anti-cancer drug cisplatin and H_2O_2 [25]. Methylation of DNA by MNNG gives rise to O^6-methylguanine (O^6-MeG), opposite which thymine can be misincorporated during replication, forming a base mismatch recognised by MMR. Defective MMR is associated with increased tolerance to MMNG [26], due to loss of what has been termed a futile cycle of repair, where MMR fails to remove O^6-MeG and instead re-inserts either cytosine or thymine opposite the lesion. In some

organisms, active MMR at MNNG damage leads to persistent DNA breaks and increased cell death [27]. H_2O_2 generates reactive oxygen species (ROS) with high capacity to damage DNA [28]. The most common DNA lesion resulting from ROS is 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG) [29]. MMR has the ability to prevent oxidative mutagenesis in *E. coli* by removing 8-oxoG or adenine misincorporated paired with 8-oxoG [30]. In *S. cerevisiae* it was demonstrated that the MSH2-MSH6 heterodimer has a direct role in removing adenine in 8-oxoG:A mispaired bases [31]. More recently, Zlatanou *et al.* proposed a non-MMR role for MSH2-MSH6 in human fibroblasts in response to oxidative damage. The model suggests that in some circumstances DNA oxidative damage by MSH2-MSH6 does not recruit other MMR proteins, but instead repair is mediated through the action of monoubiquinated-PCNA (mUb-PCNA) and Polη [32].

With the availability of the complete genome sequences of *T. brucei* and *T. cruzi* the full repertoire of the parasite's putative DNA MMR machinery was revealed to comprise homologues of MSH2, MSH3, MSH6 (originally named MSH8) [21], MLH1 and PMS1 [10, 33, 34]. However, functional characterization studies to date have been limited to a single life cycle stage in each parasite and have only tested the roles of MSH2 in *T. brucei* and *T. cruzi*, and MLH1 in *T. brucei*. Null mutants of *T. brucei msh2* (*Tbmsh2-/-*) or *mlh1* (*Tbmlh1-/-*) in BSF cells show several phenotypes characteristic of MMR-deficient cell lines: increased tolerance to MNNG, increased rates of sequence change in a number of microsatellite repeat loci, and elevated rates of homologous recombination-based integration of transformed DNA molecules carrying base mismatches relative to genomic target loci [21, 35, 36]. In addition, evidence that TbMSH2 and TcMSH2 play a role in in the oxidative stress response has been found in studies showing that *Tbmsh2-/-* BSF cells and *Tcmsh2+/-* epimastigotes are more susceptible to H_2O_2 treatment than wild type parasites [21, 37]. The role played by MSH2 in tackling oxidative damage appears not to involve a complete MMR reaction, since BSF *Tbmlh1-/-* mutants do not display equivalent increased H_2O_2 sensitivity to *Tbmsh2-/-* mutants [38]. Moreover, heterologous expression of *T. cruzi* MSH2 in *T. brucei msh2-/-* mutants shows that the American trypanosome MSH2 protein can functionally replace the endogenous MSH2 protein in the oxidative stress response, but cannot work with the *T. brucei* MMR machinery to successfully execute MMR [38]. Although only single allele knock-outs of *msh2* have been described in *T. cruzi* epimastigotes, the *T. cruzi* msh2+/- mutants display increased sensitivity to H_2O_2 treatment [37], consistent with the null mutants in *T. brucei* BSF cells [38]. However, despite evidence in both *T. brucei* and *T. cruzi* that H_2O_2-induced damage predominantly affects the kinetoplast genome when MSH2 is lost or impaired [37], the exact role of MSH2 remains elusive. Here, we have sought to clarify the role of MSH2 in the oxidative stress response of *T. brucei* and *T. cruzi*, and to ask to what extent this putative MMR-related function is conserved or diverged in the two parasites. We describe the generation of *msh2* null mutants in *T. brucei* PCF cells, which differ from BSF cells in the increased use of mitochondrial metabolism [39], with the consequence that there is greater endogenous reactive oxygen species. In addition, we describe, for the first time, the generation of *msh2* null mutants in *T. cruzi* epimastigote cells, which also rely on aerobic metabolism [40]. In both cell types, *msh2* null mutants are viable and are impaired in MMR. Unexpectedly, both mutants do not display increased sensitivity to H_2O_2 treatment, but instead, increased resistance, which we suggest to be due to parasite adaptation to the loss of a crucial molecule. Thus, we propose that MSH2 provides one of several interconnected mechanisms that are common to *T. brucei* and *T. cruzi* and allow both parasites to cope with oxidative stress.

Methods

Parasite cultures

T. brucei cultures of the Lister 427 strain were maintained as both bloodstream (BSF) and procyclic (PCF) forms. BSF parasites were maintained at 37°C, 5% CO_2 in HMI-9 (GIBCO) medium supplemented with 20% fetal bovine serum (GIBCO). Cell passages were performed every 48 hours, with population density maintained between 1 x 10^5 and 2 x 10^6 cells.mL^{-1}. PCF cells were maintained at 27°C in SDM-79 (GIBCO) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO). Weekly passages were performed, but cell density was never lower than than 5 x 10^5 cells.mL^{-1}.

Epimastigote forms of the CL Brener clone of *T. cruzi* were maintained in logarithmic growth phase at 28°C in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO) and penicillin (10,000 U.mL^{-1})/Streptomycin (10,000 μg.mL^{-1}) (GIBCO) as described by [41]. Metacyclic trypomastigotes, obtained after metacyclogenesis of epimastigotes cultures maintained in LIT medium for 15 to 20 days, were used to infect Vero cells cultured in DMEM medium (GIBCO) supplemented with 5% fetal bovine serum (GIBCO).

Parasite transfections

Transfection of PCF parasites were carried out at a density of 5 x10^6 cells.mL^{-1} resuspended in 0.5 mL of ice-cold Zimmerman medium (132 mM NaCl, 8 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, 1.5 mM KH_2PO_4, 0.5 mM $MgAc_2$, and 0.06 mM $CaAc_2$, pH 7.5) and 10 μg of DNA. The mixture was subjected to two rounds of electroporation with a Bio-Rad Gene Pulser II (1.5 kV current and 25 μF capacitance). The cells were then transferred into SDM79 medium and incubated at 27°C overnight. To select for antibiotic-resistant transfectants, parasites were diluted 1:100 and 1:10 in 96 well plates containing conditioned medium and the appropriate antibiotic and incubated for 10–14 days.

Transfection of BSF cells were carried out using AMAXA Nucleofactor (Amaxa Biosystems) with 4 x 10^7 cells resuspended in 100 μL of nucleofector solution (optimised for human T-cells) and mixed with 5–10 μg of DNA. After following the nucleofection protocol according to manufacturer instructions, the cells were serially diluted 1:10, 1:100 and 1:1000 in HMI-9 medium without antibiotic and incubated 6–12 hrs for recovery, after which 1 mL of HMI-9 medium containing antibiotic was added to each well. To select for *MSH2* or *MLH1* single allele mutants, PCF cells were selected with either 10 μg.mL^{-1} blasticidin or 1 μg.mL^{-1} puromycin; both drugs, at the same concentrations, were used to select for deletion of the second allele in the single allele mutants. To select for PCF *msh2*-/- cells in which MSH2 was re-expressed, transformants were grown in the presence of 2.5 μg.mL^{-1} phleomycin.

Transfection of *T. cruzi* epimastigotes was carried out with 10^7 cells.mL^{-1} collected during exponential growth phase and 100 μg of plasmid constructions as previously described [42]. Twenty-four hours after transfecting hygromycin resistant cell lines, 100 μg.mL^{-1} of selective antibiotic (G-418 Sulfate) was added to transfected cultures. Weekly passages were performed with increasing concentration of the selective drug (up to 200 μg.mL^{-1}). After 30–40 days, a double-resistant population was selected and cloned cell lines were obtained by plating epimastigotes on semisolid blood agarose plates with 200 μg.mL^{-1} of G-418 Sulfate and Hygromycin B, after an additional 30 days of incubation at 28°C.

Plasmid constructs to generate knockout parasites, MSH2 re-expressers and to inhibit msh2 expression by RNAi

Knockout constructs to delete *msh2* (TritrypDB Tb927.10.11020) or *mlh1* (TritrypDB Tb927.8.6840) in *T. brucei* PCF cells have been described before [21] and were generated by PCR-amplifying the 5' and 3' UTRs corresponding to each gene from TREU 927 genomic DNA and cloning into pBluescript II KS and separated by antibiotic resistance gene (BSD and/or PUR), flanked by 230 bp of β-α tubulin and 330 bp of α-β tubulin processing signals. The constructs were linearized by digestion with *Xho*I and *Not*I restriction enzymes before transfecting into *T. brucei* PCF.

Epimastigote cultures of *T. cruzi* with one of the *msh2* alleles disrupted by a Hygromycin resistance gene was generated as described by [37]. The deletion of the second allele was performed using a DNA construct containing the Neomycin phosphotransferase gene (Neo) flanked by intergenic sequences of the *HX1* and *GAPDH* regions that were PCR-amplified from the pROCK-GFP vector [42] and cloned into pGEM T-easy vector (Promega). DNA sequence corresponding to ~500 bp of the 5' and 3' end of *TcMSH2* (TritrypDB TcCLB.507711.320) coding region was inserted upstream and downstream of *HX1* and *GAPDH*, respectively, in the pTopo_HX1_Neo_GAPDH and the plasmid linearized using the *Xba*I and *Sma*I restriction enzyme digestions before transfection.

T. brucei msh2-/- BSF and PCF were transfected with an MSH2 re-expression construct, which has been described before [21] and where the *msh2* ORF integrates and replaces either the *BSD* or *PUR* resistance cassette in the mutated *msh2-/-* locus. This construct was generated using a 4.5 kb region containing the *MSH2* gene flanked by *MSH2* 5'UTR and 3'UTR. The 4.5 kb fragment was cloned into pBluescript SK II, followed by a cloned phleomycin resistant cassette downstream of the 3' UTR of the *MSH2* gene. The construct was digested with *Hind*III prior to transfection.

To generate RNAi constructs for MSH2, a 513bp region of the gene was PCR-amplified from wild type Lister 427 genomic DNA and cloned into the vector pZJM [43] where they are flanked by opposing T7 promoters and Tet operator sequences. The MSH2 RNAi plasmid was linearized with *Not*I and used to transform *T. brucei* PCF strain 427 pLew29-pLew13 developed by Wirtz *et al* [44], constitutively co-expressing T7 RNA polymerase and Tet repressor. Clones were selected with 2.5 $\mu g.ml^{-1}$ phleomycin.

RNA extraction, northern blot, cDNA generation, reverse transcriptase (RT) reaction and quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from *T. brucei* PCF form and *T. cruzi* epimastigote forms using the RNeasy kit (Qiagen). For cDNA generation RNA samples were treated, on column, with RNAse-free DNAse (Qiagen) as per the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized using High Capacity RNA-cDNA master mix (Applied Biosystems). cDNA from wild type (WT) cells, *Tbmsh2+/-* blasticidin (BSD) or puromycin (PUR) resistant clones, *Tbmsh2-/-*, *Tbmlh1+/-* BSD or PUR resistant clones and *Tbmlh1-/-* were used in reverse transcriptase (RT) PCR with specific primers for the *TbMSH2* or *TbMLH1* genes. As a positive control, primers to specifically PCR-amplify *TbRAD51* were used. For northern blot analyses, 20 μg of total RNA of *T. cruzi* WT, *Tcmsh2+/-* and three different clones of *Tcmsh2-/-* were separated in a 1.2% agarose/MOPS/formaldehyde gel. The RNA was then transferred to hybond-N+membrane (GE Healthcare) and hybridized with a *TcMSH2* specific PCR fragment previously labelled with [α-^{32}P]-dCTP using the Amersham Ready-to-Go DNA Labelling Beads (GE Healthcare). The hybridization was carried out as previously described by [45]; briefly, hybridisation was in 50% formamide buffer overnight at 42°C, after which the blot was washed twice with 2× SSC/

0.1% SDS at 65°C for 20 min. The membrane was then exposed to a phosphor screen of the STORM 820 phosphor image (GE Healthcare) and analysed by ImageQuant TL software (GE Healthcare). To quantify levels of mRNA by RT-PCR after RNAi induction, primers specific for *msh2* and *mlh1* genes were used. As a endogenous control primers for GPI8 gene (TriTrypDB Tb427.10.13860) were used. SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) was used for PCR in 96 well plates. Reactions were run on an ABI Prism 7000 thermocycler and mRNA levels quantified from amplification according to the manufacturer's instructions;

Microsatellite instability

T. brucei PCF MMR mutants were tested for genetic instability by PCR amplification of the region containing the JS-2 microsatellite from parasites grown in the absence or presence of 20 μM H_2O_2 for 48 hours. The JS-2 microsatellite has been mapped to Chromosome IV and is composed of GT-dinucleotide repeats [46]. Genomic DNA was extracted from 10 independent clonal populations derived from PCF wild type and knockout mutants and PCR-amplified with JS2 microsatellite complementary primers. PCR products were resolved for 50 minutes at 100 V by electrophoresis in a 3% low melting agarose gel.

Treatment with genotoxic agents

Mid-log phase PCF *T. brucei* cultures were inoculated in SDM-79 (GIBCO) at density of 5 x 10^5 cells.mL^{-1} in the absence or presence of 2.5 μM or 5 μM N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, Tokyo chemical industry Ltd). After 72 hours survival was determined using a haematocytometer. *T. cruzi* epimastigote form cells in the exponential growth phase were counted and diluted to 1x 10^7 cells.mL^{-1} in LIT medium in the absence or presence of 5 μM MNNG (Tokyo chemical industry Ltd). After 72 hours cell densities were determined by counting live cells with a haematocytometer using Erythrosin B exclusion.

Mid-log phase *T. brucei* PCF cells were diluted to 5 x 10^5 cells.mL^{-1} in SDM-79 (GIBCO) and then incubated with 10 μM or 20 μM H_2O_2 (VWR) at 27°C for 48–72 hours. BSF cells were diluted to 1 x 10^6 cells.mL^{-1} in HMI-9 medium (GIBCO) and incubated with 100 μM or 200 μM H_2O_2 (VWR) at 37°C, 5% CO_2 for 48 hours. After growth, cell density was measured using a haematocytometer. *T. cruzi* epimastigote form in exponential growth phase were diluted to 1x 10^7 parasites.mL^{-1} in PBS 1x and incubated with 75 μM H_2O_2 (Sigma-Aldrich) for 20 minutes at 28°C. After this, the cells were centrifuged, washed once with PBS and allowed to recover in LIT medium for 48 hours before cell densities were determined by counting live cells with a haematocytometer using Erythrosin B exclusion.

Cell growth analyses after induction of RNAi

Two clones of PCF RNAi cell line targeting MSH2 were grown to log phase and diluted to a starting density of 5 x 10^5 cells.mL^{-1}. Each culture was then split and grown in the absence of tetracycline or after the addition of tetracycline to 2 μg.mL^{-1}. Cell density was determined every 24 hours up to 72 hours and then the cultures were diluted to their starting density. After adding again tetracycline to induce siRNA expression, parasite numbers were further determined every 24 hours for a further 72 hours, before diluting again the cultures back to starting densities.

T. cruzi in vitro infection of Vero cells and mouse macrophages

Trypomastigotes released in the supernatants of infected Vero cells were counted with a haemocytometer and an equivalent cell number for each culture was used to infect Vero cells or

intraperitoneal macrophages (harvested from BALB/c mice) that had been allowed to adhere to glass cover slips in a 24 well plate. Trypomastigotes were incubated with the cell monolayers for 4 hours, after which non-internalized trypomastigotes were washed away with PBS 1x. The infected cells were incubated for an additional 48 hours at 37°C. The number of intracellular amastigotes was determined by staining cell nuclei with DAPI (1000 $\mu g.mL^{-1}$) and visualised through fluorescence microscopy (Olympus). The average number of amastigotes was determined from analysing 1000 host cells, in different fields of the microscopy slide.

In vitro infection of BALB/c mice macrophages were carried out in strict accordance with the Brazilian laws regarding animal use (Law # 11.794, December 8, 2008), following a protocol approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of UFMG (CETEA-UFMG) under the number 132/2014.

8-oxoguanine measurement

8-oxoG measurement was performed based on the principle of binding affinity of FITC-conjugated avidin to 8-oxoG [47] and an adapted protocol [48], which has been previously used to quantify oxidative DNA lesions in different *T. cruzi* strains and mutants for different DNA repair proteins [37, 49, 50]. Briefly, 20 μL aliquots of cell suspensions were distributed on a glass slide coated with poly-lysine (Sigma-Aldrich) and left to adhere for 5–10 min, after which cells were fixed with ice-cold methanol for 20 min at -20°C. The methanol-fixed cells were then washed with room temperature PBS 1x, cells permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 3 min and incubated with RNase A (100 $\mu g.mL^{-1}$) for 1 hour at 37°C. After another wash with PBS 1x, cells were treated with proteinase K (10 $\mu g.mL^{-1}$) for 7 min at room temperature, followed by treatment with HCl (4N) for 7 min at room temperature and overnight blocking with 10% fetal bovine serum. FITC-avidin was diluted 1:200 in blocking buffer and incubated with the cells for 1 hour at room temperature. After extensive washing with PBS, cell nucleus and kDNA were stained with DAPI. Slides were mounted with prolong gold anti-fade solution (Molecular Probes/Life Technologies), visualized under a fluorescence microscope and images of at least 10 different fields were captured. After manually delimiting the nucleus and the kDNA of each parasite, as visualized by DAPI staining, FITC- fluorescence intensity restricted to these sites were determined with ImageJ software and plotted as the average fluorescence (arbitrary units) of 100 random cells.

Epitope tagging MSH2

T. brucei BSF, PCF and *T. cruzi* epimastigote cells were transfected with constructs to tag MSH2 C-terminally in the endogenous locus. Primers were generated against a C-terminal region of *msh2* ORF, but excluding the stop codon. The region was selected to have a unique restriction enzyme recognition site within the ORF fragment that could be used to linearize the DNA. This fragment was cloned into the plasmid $pNAT12^{myc}$ [51] allowing in frame fusion of the ORF with 12 repeats of the c-MYC epitope. Similarly, the C-terminal region of *Tcmsh2* ORF was cloned in pCR 2.1 Topo vector (Life Technologies) in frame with the 12 repeats of the c-MYC epitope derived from the *T. brucei* $pNAT12^{myc}$ plasmid. As a selective mark, neomycin resistance gene derived from the pROCK_Neo plasmid [42] was also cloned in the same pCR 2.1 Topo vector. The constructs were linearized with *BmgB*I (for *T. brucei*) or *Sal*I (for *T. cruzi*) restriction enzymes and used to transfect heterozygous *msh2* knockout mutants of *T. brucei*, and wild type *T. cruzi* epimastigotes; transfected *T. brucei* or *T. cruzi* were selected with 10 $\mu g.mL^{-1}$ blasticidin or 200 $\mu g.mL^{-1}$ G418 Sulfate, respectively.

Cellular localization

T. brucei BSF and PCF expressing MSH2 fused to 12x c-MYC epitopes were fixed in chilled methanol for 1 hour or overnight. Fixed slides were then blocked with 2% fetal calf serum (FCS), incubated with mouse anti-c-MYC antiserum (1:5000) (Millipore) for 1 hour, followed by incubation with Alexafluor 594 conjugated anti-mouse IgG secondary antiserum (Molecular Probes/ Life Technologies) in the dark. Slides were mounted with vectashield containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector labs) and visualized on a Zeiss Axioplan microscope. Images were captured using Hamamatsu ORCA-ER digital camera and Openlab software. *T. cruzi* epimastigote and amastigote cells expressing MSH2 fused to 12x c-MYC epitopes were fixed with 4% paraformaldehyde for 5 minutes, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min, blocked with 1% BSA, 0.2% Tween 20 for 1 hour at room temperature and incubated with 1:500 anti-c-MYC antiserum conjugated to Alexa 488 (Milipore) for 1 hour. After washing with PBS, nuclei were stained with 1 $\mu g.mL^{-1}$ of DAPI (Molecular Probes/ Life Technologies) for 5 min and cover slides mounted with prolong gold anti-fade solution (Molecular Probes/ Life Technologies). Images were captured on an Olympus BX60 microscope using Q-color 5 digital camera and Qcapture Pro 6.0 software.

Statistical analysis

Statistical analyses in this work were performed using GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego California USA). Data are presented as mean plus standard deviation, and all experiments were repeated at least three times. Results were analysed for significant differences using ANOVA followed by Bonferroni post-test. Statistical tests used are described at each figure legend. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

T. brucei procyclic form and *T. cruzi* epimastigote *msh2* null mutants have increased resistance to oxidative stress

The genomes of *T. brucei* and *T. cruzi* each contain a single-copy gene encoding MSH2 [33, 34]. To generate *T. brucei* PCF *msh2* null (-/-) mutants, we relied upon the same constructs used previously to make BSF cells in which both *msh2* alleles were deleted [21] (S1 Fig). In parallel, we also generated *T. brucei* PCF *mlh1*-/- mutants, again using pre-existing constructs. For both genes, the constructs replace the entire ORF (2856 bp and 2664 bp for *MSH2* and *MLH1*, respectively) after homologous integration. Cells with a single allele deleted (heterozygous mutants; +/-) were first selected using either a construct encoding resistance to blasticidin (*BSD*) or puromycin (*PUR*) and confirmed by PCR (S2 Fig). The +/- cells were then transformed with the reciprocal construct to attempt to make-/- mutants lacking both alleles; in both cases, and for reasons that are unclear, this was only successful when transforming the *PUR* deletion constructs into the cells that had integrated *BSD* and, furthermore, required a number of transformation attempts using varying antibiotic selection concentrations. Correct integration of the constructs and loss of both *TbMSH2* or *TbMLH1* alleles in the-/- mutants were confirmed by PCR (S2 Fig). Deletion of both alleles in the PCF-/- mutants was further verified by RT-PCR amplification of RNA extracted from drug resistant parasites: as shown in Fig 1A, PCR products from the ORFs were detected in +/- cells as well as in wild type (WT) parasites, but not in the-/- mutants.

To generate *T. cruzi* epimastigote *msh2*-/- mutants, we started with clones in which one *MSH2* allele was deleted (+/- cells) [37] and replaced by the ORF for the hygromycin phosphotransferase (*HYG*) gene. It should be noted that in the *msh2* heterozygous mutants (+/-) the

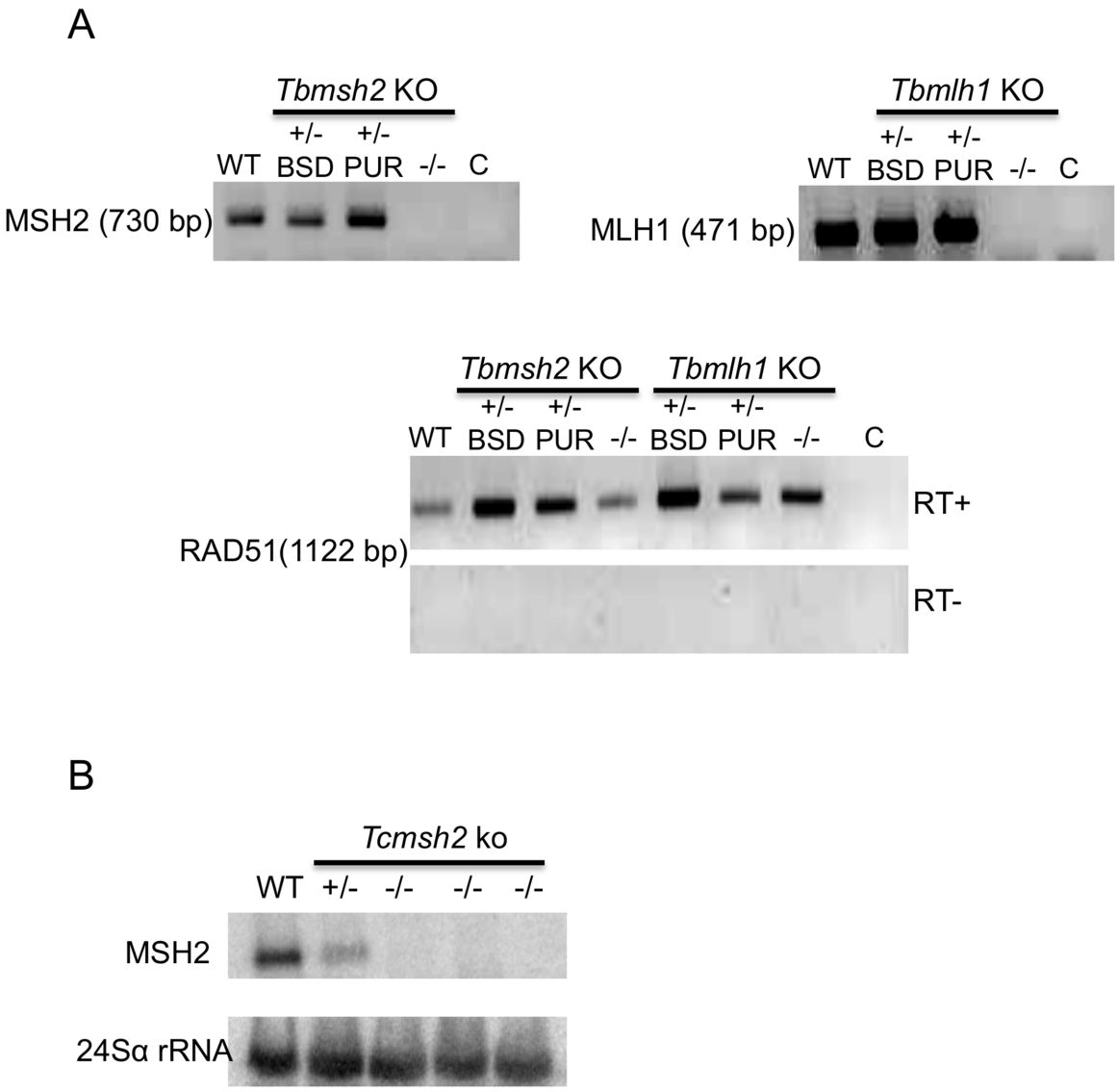


Fig 1. Generation of mismatch repair null mutants in *T. cruzi* and *T. brucei*. (**A**) Agarose gel electrophoresis of reverse transcriptase (RT) PCR products to verify the absence of *MSH2* or *MLH1* mRNA in *T. brucei* procyclic form mutants. cDNA derived from wild type (WT) cells, blasticidin (BSD) or puromycin (PUR) resistant clones of *Tbmsh2* single allele knockouts (+/-) and *Tbmsh2* double allele knockouts (-/-) were PCR-amplified with *MSH2* or *MLH1*- specific primers; the size of the PCR product is indicated and a control reaction without cDNA is indicated by C. The bottom panel shows, as positive controls, cDNAs from the same cells PCR-amplified (RT+) with primers specific for the *RAD51* gene; a control for genomic DNA contamination, in which reverse transcriptase was excluded from the cDNA synthesis reaction (indicated by RT-) is also shown. (**B**) Total RNA extracted from *T. cruzi* epimastigote form wild type (WT) cells, a *Tcmsh2* single allele knockout (+/-) mutant and three independent clones of *Tcmsh2* double allele knockouts (-/-) were transferred to a nylon membrane and hybridized with [α-^{32}P]-labeled probe specific for the *T. cruzi MSH2* gene. The bottom panel shows hybridization with a probe for 24Sα rRNA, used as loading control.

doi:10.1371/journal.pntd.0003870.g001

HYG mRNA is generated by the predicted 5' and 3' processing signals flanking the *MSH2* gene. In order to mutate the remaining allele, we found it was necessary to use a gene disruption construct (S1 Fig) in which a neomycin phosphotransferase gene ORF (*NEO*) was flanked upstream by processing signals derived from the *T. cruzi* intergenic region of the TcP2β gene [52], and downstream by the intergenic region derived from the *gapdh* gene [42]. To allow integration into the remaining *MSH2* allele, homologous targeting was based on *TcMSH2* ORF sequence, and not on the 5' and 3' UTRs, as used before to generate the *msh2*+/- mutants.

Finally, in order to successfully select for-/- cells, in which the first allele was deleted and the second disrupted, transformed parasites had to be selected initially with a low drug concentration (100 μg.mL^{-1}) that was gradually increased to 150 μg.mL^{-1} and 200 μg.mL^{-1} during a period of 4 weeks. PCR amplification of DNA extracted from the *Tcmsh2*+/- cells, and from three cloned putative *Tcmsh2*-/- cell lines showed the expected integration of the different *MSH2* targeting constructs in the *T. cruzi* genome (S1 Fig). Northern blots using a probe specific for the *TcMSH2* ORF and for the 24Sα rRNA as a loading control showed 52% less *TcMSH2* mRNA in the +/- cells relative to WT, and no detectable *MSH2* mRNA in the *Tcmsh2*-/- clones (Fig 1B), confirming the gene disruption. The apparent reduction in *TcMSH2* mRNA levels in the +/- cells is consistent with the observation of altered phenotypes in these cells relative to WT (see below; and [37]). Similar to *T. brucei msh2* mutants, no changes in population doubling times were detected when comparing growth of WT cells to the *T. cruzi* mutants with one or both *msh2* alleles deleted (S3 Fig).

To ask if the mutations described above result in detectable loss of MMR, we measured the sensitivity of the parasites to MNNG [26]. *T. brucei* and *T. cruzi* mutants and WT cells were grown for 72 hours with increasing concentrations of MMNG. Survival of the cells was determined by measuring the cell density of the WT or mutant cells after MNNG treatment relative to untreated cells. In *T. brucei*, all cells showed increasing growth impairment as MNNG was increased from 2.5 to 5 μM. However, similar to what has been described in BSF cells [21], and consistent with the proposed futile cycle of alkylation repair in MMR-proficient cells [26, 27], deletion of one allele of *Tbmsh2* or *Tbmlh1* in the PCF+/- mutants caused increased tolerance to MNNG, and this tolerance increased yet further when both alleles were deleted in the-/- mutants (Fig 2A). Deletion of *TbMSH2* or *TbMLH1* in PCF cells also resulted in the-/- parasites displaying increased microsatellite instability, as was observed in *T. brucei* BSF mutants, indicating decreased replication fidelity (S4 Fig). In *T. cruzi* increased tolerance to 5 μM MNNG was seen in the *Tcmsh2*+/- cells and was not detectably increased in the-/- mutants (Fig 2B). Though this somewhat contrasts with the response of *T. brucei* MMR mutants to MNNG, these data nonetheless show that mutation of MMR genes in either parasite resulted in the expected enhanced survival in the presence of this alkylating drug.

To ask how the loss of the MMR genes affects the response of *T. brucei* and *T. cruzi* cells to oxidative stress, we compared growth of the WT cells and mutants in the presence of H_2O_2, again determining survival in the presence of the damaging agent relative to undamaged cells. In striking contrast to our previous observations in *T. brucei*, which showed that *Tbmsh2*-/- BSF cells are more susceptible to H_2O_2 [38], PCF *T. brucei msh2* mutants were more resistant to H_2O_2 than WT cells after 48 hrs growth at either 10 μM or 20 μM (Fig 3A): improved survival was seen in both the *msh2*+/- and *msh2*-/- cells at this time point, and was also observed 24 and 72 hrs post-treatment (S5 Fig). In contrast, though *T. brucei mlh1*+/- mutants displayed a modest increase in H_2O_2 resistance (in particular upon treatment with 10 μM H_2O_2; Fig 3A), *mlh1*-/- mutants displayed no detectable difference from WT, indicating that the MMR response to H_2O_2 damage is predominantly mediated through MSH2 and not MLH1. This separation in function between the two MMR factors is consistent with observations in *T. brucei* BSF cells, though with distinct patterns of H_2O_2 sensitivity [38]. Analysis of the *T. cruzi* epimastigote mutants revealed that loss of both *msh2* alleles also resulted in increased resistance to H_2O_2 in these parasite, though loss of one *msh2* allele resulted in increased sensitivity to 75 μM H_2O_2, which is distinct from *T. brucei msh2*+/- mutants [38] and consistent with previous findings [37] (Fig 3B). Taken together, the enhanced survival of PCF *T. brucei msh2* null mutants to H_2O_2 exposure suggests a life cycle difference in the consequence of this mutation relative to BSF cells. Moreover, this unexpected phenotype is conserved in epimastigote *T. cruzi msh2* null mutants.

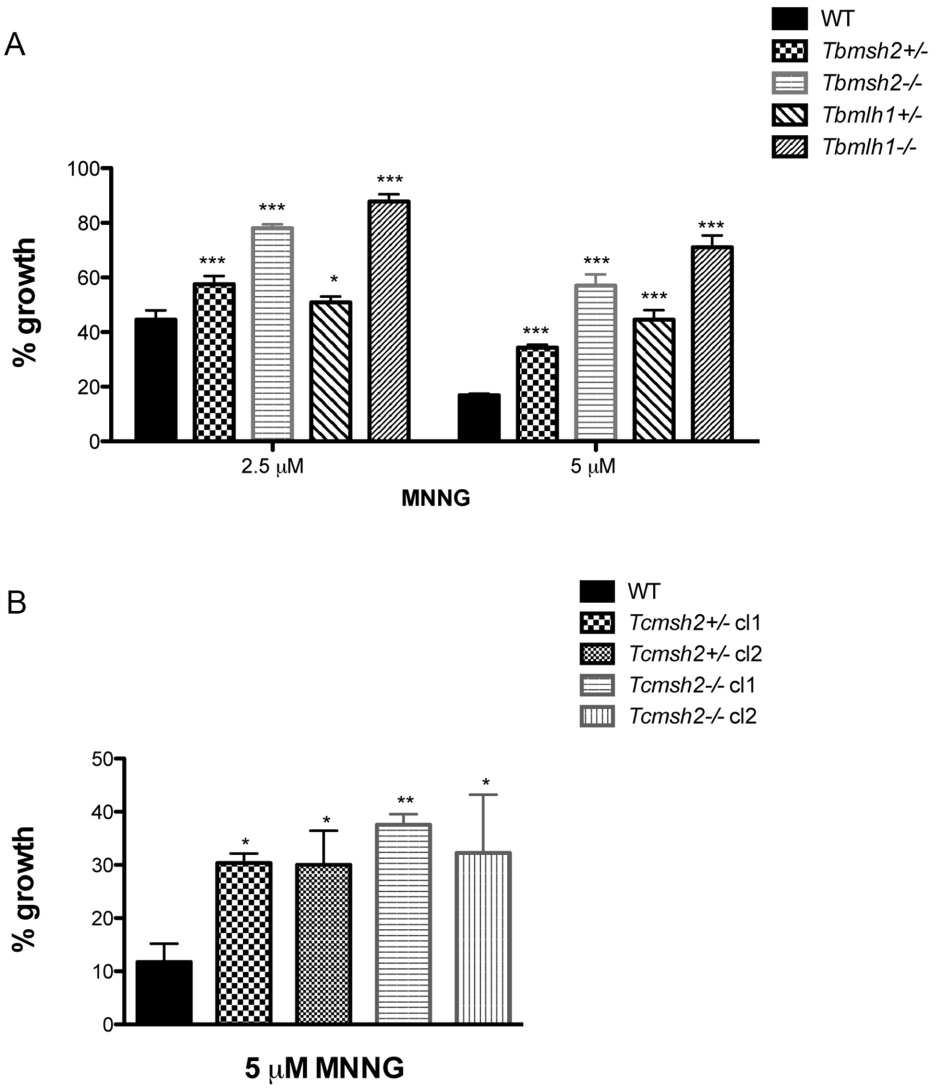


Fig 2. Susceptibility of *T. brucei* and *T. cruzi* MMR knockout mutants to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). (**A**) *T. brucei* wild type (WT) and procyclic form mutants (*Tbmsh2*+/-, *Tbmsh2*-/-, *Tbmlh1*+/- and *Tbmlh1*-/-) were grown in culture medium with 0 μM, 2.5 μM or 5 μM MNNG. Cell density was measured after 72 hours growth and is plotted as the percentage survival of the MNNG treated cells relative to untreated cultures. (**B**) WT *T. cruzi* epimastigotes and MSH2 mutants (*Tcmsh2*+/- and *msh2*-/-) were grown in culture medium with 0 μM or 5 μM MNNG. Cell viability was measured after 72 hours and is plotted as the percentage survival of the MNNG treated cells relative to untreated cultures. Vertical lines indicate standard deviation. ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05: determined by one-way ANOVA with Bonferroni post-test of knockout mutants relative to wild type cells.

doi:10.1371/journal.pntd.0003870.g002

T. cruzi msh2 null mutants have increased survival in macrophages

To investigate the role of MSH2 in protecting *T. cruzi* against oxidative stress generated by host cells, we compared the capabilities of *T. cruzi* WT and *msh2*-/- mutants to infect two different cell types: Vero cells and mouse macrophages. Equal numbers of trypomastigotes derived from Vero cells infected with WT and *msh2*-/- mutants were added to cultures of the two cell types and the numbers of intracellular amastigotes were determined 2 days later by staining parasite nuclei with DAPI. As shown in Fig 4A, no difference in the number of intracellular amastigotes was observed in Vero cells infected with WT or *Tcmsh2*-/- parasites.

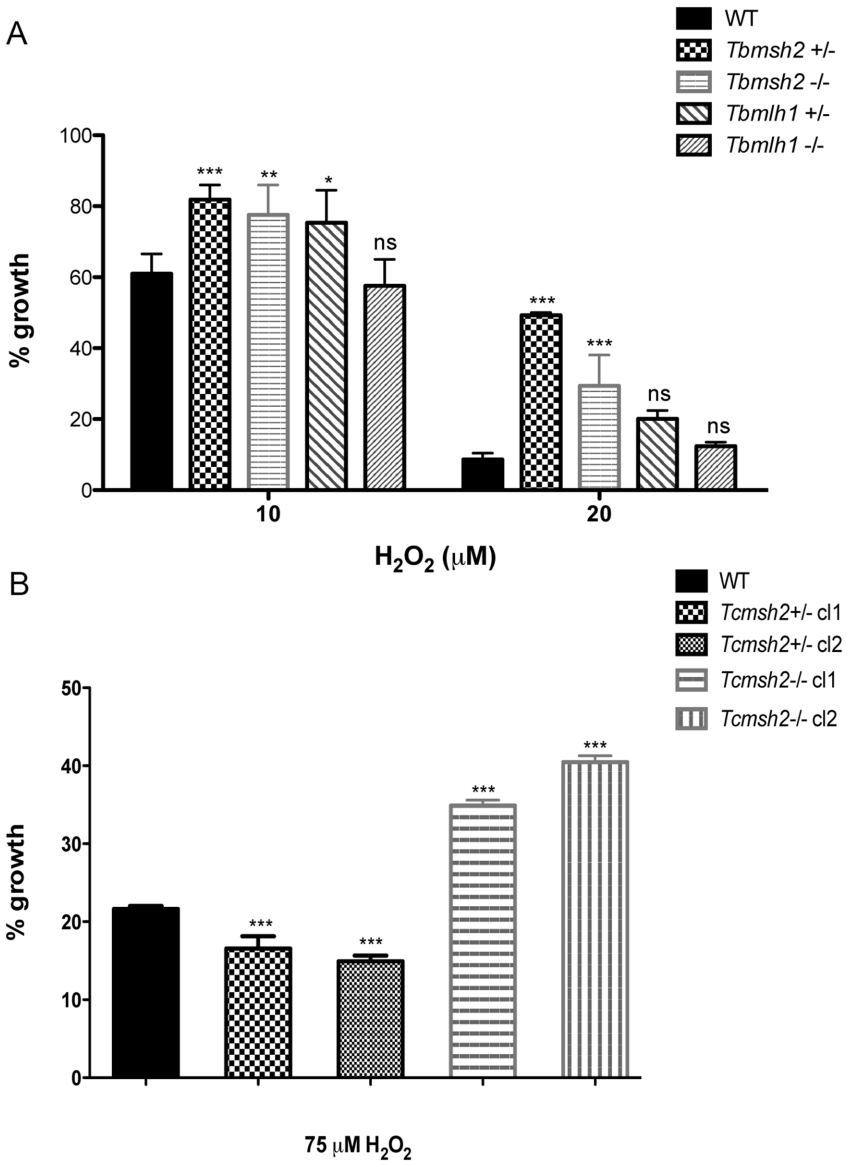


Fig 3. MSH2 knockout mutants are more resistant to oxidative stress generated by H_2O_2. (**A**) *T. brucei* wild type (WT), *msh2*+/-, *msh2*-/-, *mlh1*+/- and *mlh1*-/- procyclic form cells were grown in culture medium with 0 μM, 10 μM or 20 μM H_2O_2. Cell density was measured after 48 hours and plotted as the percentage survival of the H_2O_2 treated cells relative to untreated. (**B**) *T. cruzi* epimastigote WT, *msh2*+/- and *msh2*-/- cells were incubated with or without 75 μM H_2O_2 for 20 minutes in PBS 1x and then allowed to grow in LIT medium for 48 hours, after which cell viability was determined and plotted as percentage survival of the treated cells relative to untreated. Vertical lines show standard deviation. ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05: determined by one-way ANOVA with Bonferroni post-test of mutants relative to wild type cells; ns indicates no signifcant difference.

doi:10.1371/journal.pntd.0003870.g003

However, infections with each of the three *Tcmsh2*-/- clonal cell lines resulted in a 3-fold increase in the number of intracellular amastigotes relative to infection with WT cells in cultivated mouse macrophages (Fig 4B). As macrophages generate ROS, through an infection-induced respiratory burst [6], while Vero cells do not, these infection data appear consistent with the increased resistance of *T. cruzi msh2*-/- null mutants to H_2O_2 treatment (see Fig 3B).

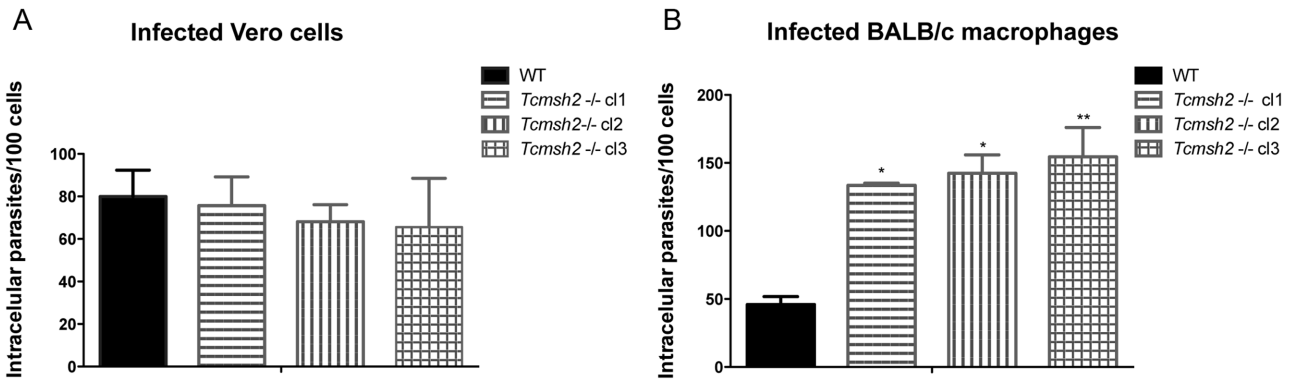


Fig 4. Assessment of *T. cruzi msh2* knockout mutant infectivity *in vitro*. (**A**) *T. cruzi* trypomastigote cells released by Vero cells infected with either WT or with three cloned cell lines of *Tcmsh2-/-* mutants were counted and equal numbers were used to infect Vero cells attached to glass coverslips or (**B**) cultured intraperitoneal macrophages extracted from BALB/c mice. Graphs show the average number of intracellular parasites counted per 100 cells; vertical lines denote standard deviation. **p<0.01, *p<0.05: one-way ANOVA with Bonferroni post-test of knockout mutants relative to wild type.

doi:10.1371/journal.pntd.0003870.g004

The infection data also indicate that the increased capacity to survive exposure to oxidative stress is maintained after *T. cruzi* differentiates into other life cycle stages.

T. brucei and *T. cruzi msh2* mutants accumulate 8 oxoguanine in their DNA

The increased resistance to oxidative stress observed in *T. brucei* PCF cells and *T. cruzi* epimastigotes after MSH2 mutation could be a direct consequence of the loss of this MMR component, or could be due to indirect effects, such as a metabolic adaptation. To begin to address this, we determined the capacity of mutant cells to limit the accumulation of oxidized bases in their genome, which can arise from exposure to ROS generated by endogenous parasite metabolism or from the host. The primary DNA lesion generated by oxidative damage is 8-oxoG, which, if not removed by base-excision repair, can be recognized by MMR [26]. We therefore measured the levels of this oxidized base in the WT and *msh2* mutant parasite genomes using avidin-conjugated FITC and measuring fluorescence [47]. As shown in Fig 5A and 5B, PCF *T. brucei msh2+/-* and *msh2-/-* mutants each displayed ~2 fold greater fluorescence in their nuclear DNA (nDNA) and kinetoplast DNA (kDNA) compared with WT cells. These fluorescence data indicate that the levels of 8oxoG were no greater in the *T. brucei msh2-/-* mutants than in the *Tbmsh2+/-* mutants, consistent with the observation that the two mutants display equivalent levels of resistance to H_2O_2 (Fig 3). In contrast, no difference was observed in the levels of fluorescence in the nDNA or kDNA of *mlh1* mutants related to WT (Fig 5B), a distinction from *T. brucei msh2* mutants again consistent with the separation of MMR functions observed when examining levels of resistance to H_2O_2. Increased levels of avidin-FITC fluorescence were also seen in the nDNA and kDNA of *T. cruzi* epimastigote *msh2* mutants: 1.7 to 1.9 fold increase in fluorescence was seen in the nDNA and kDNA of both *Tcmsh2+/-* clones and both *Tcmsh2-/-* clones examined relative to WT (Fig 5C). These data suggest that loss or reduction of MSH2 expression (but not MLH1) in PCF *T. brucei* and in epimastigote *T. cruzi* results in the impairment of a pathway involved in the repair of DNA-directed oxidative damage, such as 8-oxoG. Thus, the increased resistance to H_2O_2 in the mutants is best explained by an indirect adaptation to cope with oxidative stress following MSH2 mutation.

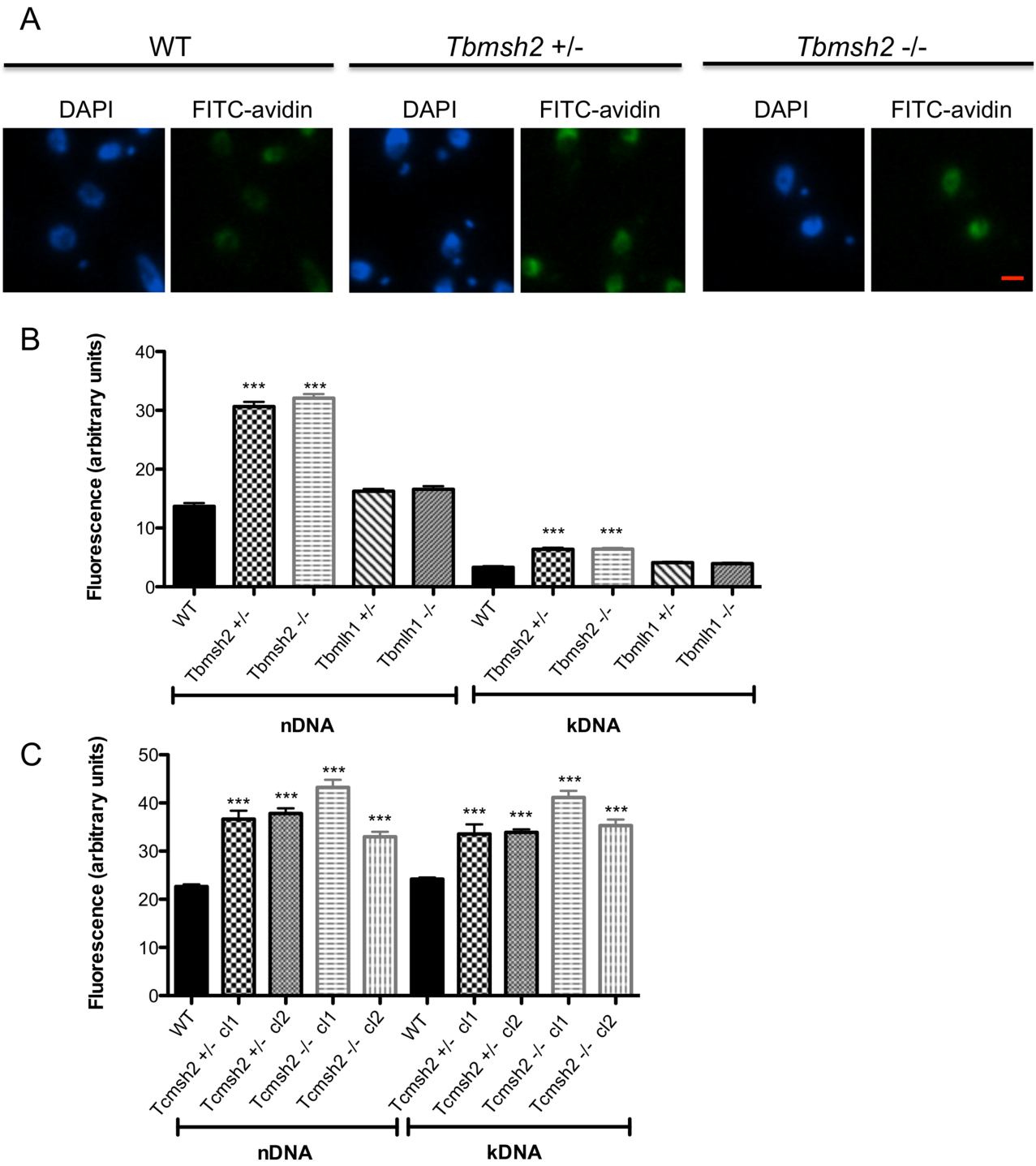


Fig 5. 8-oxoguanine (8-oxoG) accumulation in MSH2 knockout cells. FITC-avidin was used to estimate 8-oxoG levels based on the fluorescence intensity in the nuclear DNA (nDNA) and kinetoplast DNA (kDNA) of *T. brucei* procyclic forms and *T. cruzi* epimastigotes. (**A**) Representative images of FITC-avidin or DAPI stained *T. brucei* WT cells and *Tbmsh2*+/- or *Tbmsh2*-/- mutants are shown. (Bar = 1.9 μM) (**B**) Fluorescence intensity of FITC-avidin signals were quantified in the nDNA and kDNA using ImageJ software and plotted as arbitrary units; values shown are the average signal from 100 WT, *Tbmsh2*+/-, *Tbmsh2*-/-, *Tbmlh1*+/- or *Tbmlh1*-/- PCF cells; vertical lines show standard error (SEM). (**C**) FITC-avidin signal evaluated by the same process in *T. cruzi* epimastigote WT cells and in *msh2*+/- and *msh2*-/- knockout mutants. ***p<0.001: determined by one-way ANOVA with Bonferroni post-test of knockout mutants relative to wild type; ns indicates no signifcant difference.

doi:10.1371/journal.pntd.0003870.g005

Functional complementation confirms adaptation following loss of MSH2 in procyclic form *T. brucei* mutants

In order to test further if H_2O_2 resistance in *msh2* mutants results from an adaptation process that occurred in insect life stages of *T. brucei*, we re-expressed MSH2 in both the BSF and PCF *msh2*-/- cells, using a previously described construct and conditions [21]. Integration of the MSH2 re-expression construct was confirmed by PCR (S6 Fig), and southern blot in BSF [21]. Both BSF and PCF *msh2* mutants display increased tolerance to MNNG (Fig 2A), and re-expression of MSH2 in BSF *msh2*-/- mutants reverts this tolerance to the levels of *msh2*+/- mutants [21, 38]. As shown in Fig 6A, re-expressing MSH2 (*Tbmsh2*-/-/+) in the PCF *msh2*-/- mutants also resulted in levels of MNNG survival similar to *msh2*+/- cells. In addition, and as seen in *T. brucei* BSF msh2-/-/+ cells [21], PCF msh2-/-/+ cells no longer showed detectable microsatellite variation in clonal growth assays (S7 Fig). Taken together, these assays indicate that MMR function can be restored in *T. brucei msh2* null mutants in both life cycle stages after re-introduction of MSH2 into the genome. In contrast, MSH2 re-expression had a different outcome for H_2O_2 sensitivity in the two life cycle stages. When *T. brucei* PCF *msh2*-/-/+ cells were grown in the presence of 10 μM or 20 μM H_2O_2 for 48 or 72 hrs, there was no significant difference in survival relative to the *msh2*-/- mutants, and survival was significantly different from the *msh2*+/- mutants (Fig 6B). However, in BSF *T. brucei*, the survival of the *msh2*-/-/+ cells (in this case after 48 hrs growth in either 100 or 200 μM H_2O_2) was indistinguishable from the *msh2*+/- cells and significantly greater than the *msh2*-/- mutants (Fig 6C). Thus, while re-expression of MSH2 in *T. brucei msh2*-/- null mutants was able to restore MMR function in both life cycle stages, the same re-expression was able to revert the increased sensitivity to H_2O_2 only in BSF *msh2*-/- mutants. In contrast, the increased tolerance to H_2O_2 observed in PCF after loss of MSH2 could not be reverted by re-expressing this gene in this life cycle form of *T. brucei*. This lack of MSH2 complementation is most simply explained by changes in expression or function of another factor(s) that allowed PCF MSH2 mutants to cope specifically with oxidative stress, though we cannot rule out the possibility of this specific phenotypic difference between BSF and PCF cells arising due to differing levels of MSH2 in the two life cycle stages and in the *msh2*-/-/+ re-expressers. As suggested by RNAi data (S8 Fig), the adaptation process that may have occurred during the cloning period needed to generate the *msh2*-/- mutants requires several generations. When MSH2 expression is abruptly inhibited by tetracycline induction of siRNA in *T. brucei* PCF cells, a discernible slowing of growth is observed as a consequence of the reduced *msh2* mRNA expression.

T. brucei and *T. cruzi* MSH2 display nuclear localization

In this study, and in previous work [37], we have shown that deletion of *msh2* results in increased levels of 8-oxoG in both the nDNA and kDNA. Indeed, in BSF *T. brucei* the most pronounced cell cycle effect of MSH2 loss, which is exacerbated by H_2O_2 treatment, is the accumulation of cells with reduced amounts of kDNA (evaluated by DAPI staining) [37]. Because of these findings, and coupled with lack of a detectable kinetoplastid homologue of MSH1 (a MutS-like factor involved in mitochondrial genome repair, including oxidative damage repair) [53, 54], we hypothesized that MSH2 could provide a repair function for the trypanosomes' mitochondrial (kDNA) genome. To test this hypothesis, we expressed *T. brucei* and *T. cruzi* MSH2 as C-terminal fusions with a 12X c-MYC epitope. For *T. brucei*, MSH2-myc was expressed from the endogenous locus in both BSF and PCF cells in which the other *MSH2* allele was deleted; by evaluating MNNG sensitivity, we showed that the epitope tag did not affect the function of MSH2 in BSF cells (S9 Fig). As shown Fig 7A and 7B, immunolocalization of MSH2:myc with anti-c-MYC antiserum in *T. brucei* BSF and PCF cells revealed only a nuclear

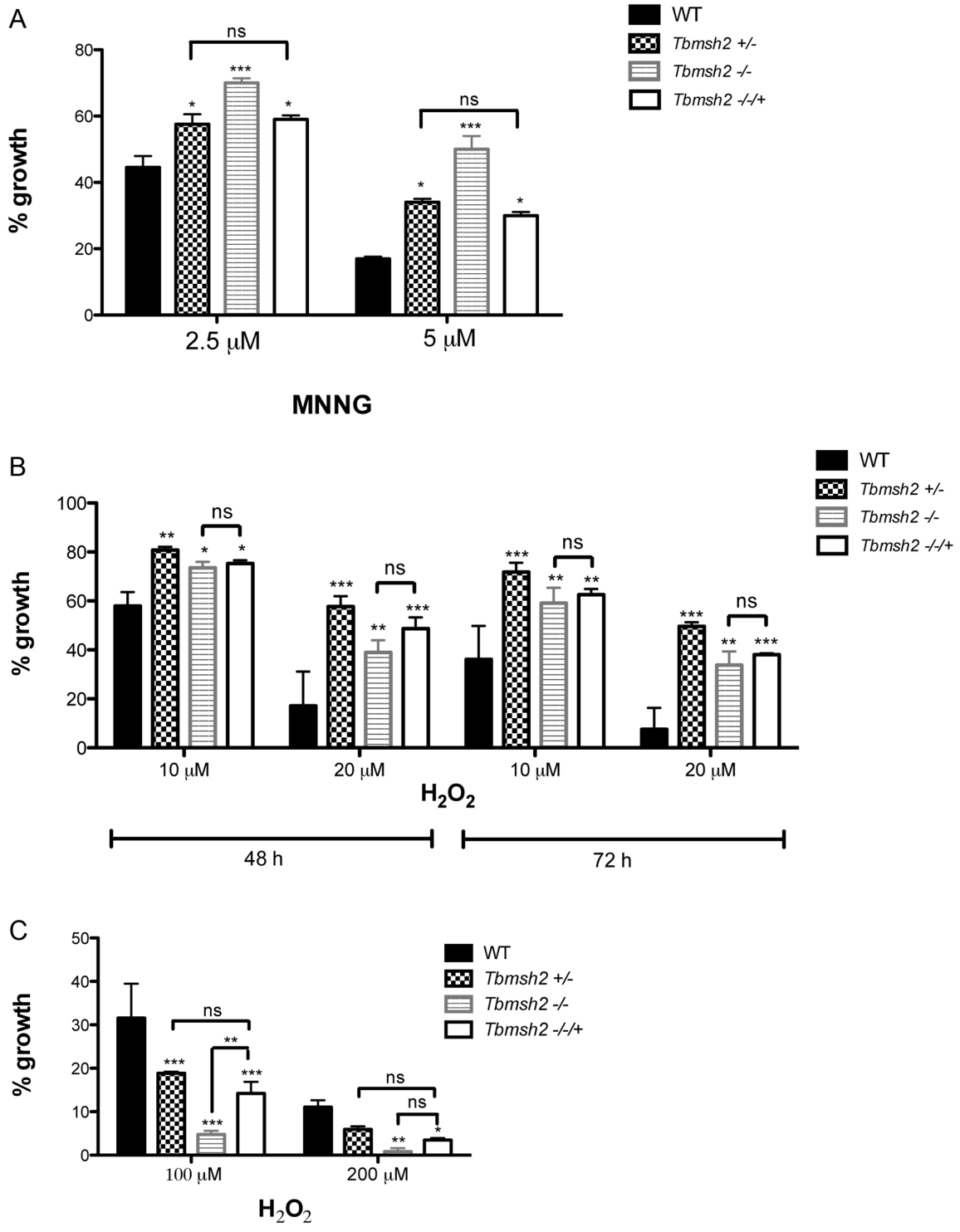


Fig 6. Re-expression of MSH2 in *T. brucei msh2* null mutants. (**A**) Procyclic form (PCF) *T. brucei* (Tb) wild type (WT), *Tbmsh2*+/-, *Tbmsh2*-/- and *Tbmsh2*-/- cells in which MSH2 is re-expressed (*Tbmsh2*-/-/+) were grown in culture medium with 0 μM, 2.5 μM or 5 μM MNNG. Cell density was measured after 72 hours growth and is plotted as the percentage survival of the MNNG treated cells relative to untreated. (**B**) PCF WT, *Tbmsh2*+/-, *Tbmsh2*-/- and *Tbmsh2*-/-/+ cells were grown in culture medium with 0 μM, 10 μM or 20 μM H_2O_2 and cell density was determined 48 and 72 hours later; growth is shown percentage survival of the treated cells relative to untreated (**C**) Growth of wild type bloodstream form (BSF) *T. brucei* cells was compared to *Tbmsh2*+/-, *Tbmsh2*-/- and *Tbmsh2*-/-/+ BSF mutants in the presence of 100 μM or 200 μM H_2O_2 as described above; graph shows survival of the mutants after 48 hours growth plotting the density of the treated cells as a percentage of the untreated; vertical lines show standard deviation. ***p<0.001, **p<0.001: determined by one-way ANOVA with Bonferroni post-test of mutants relative to wild type; ns indicates no significant difference.

doi:10.1371/journal.pntd.0003870.g006

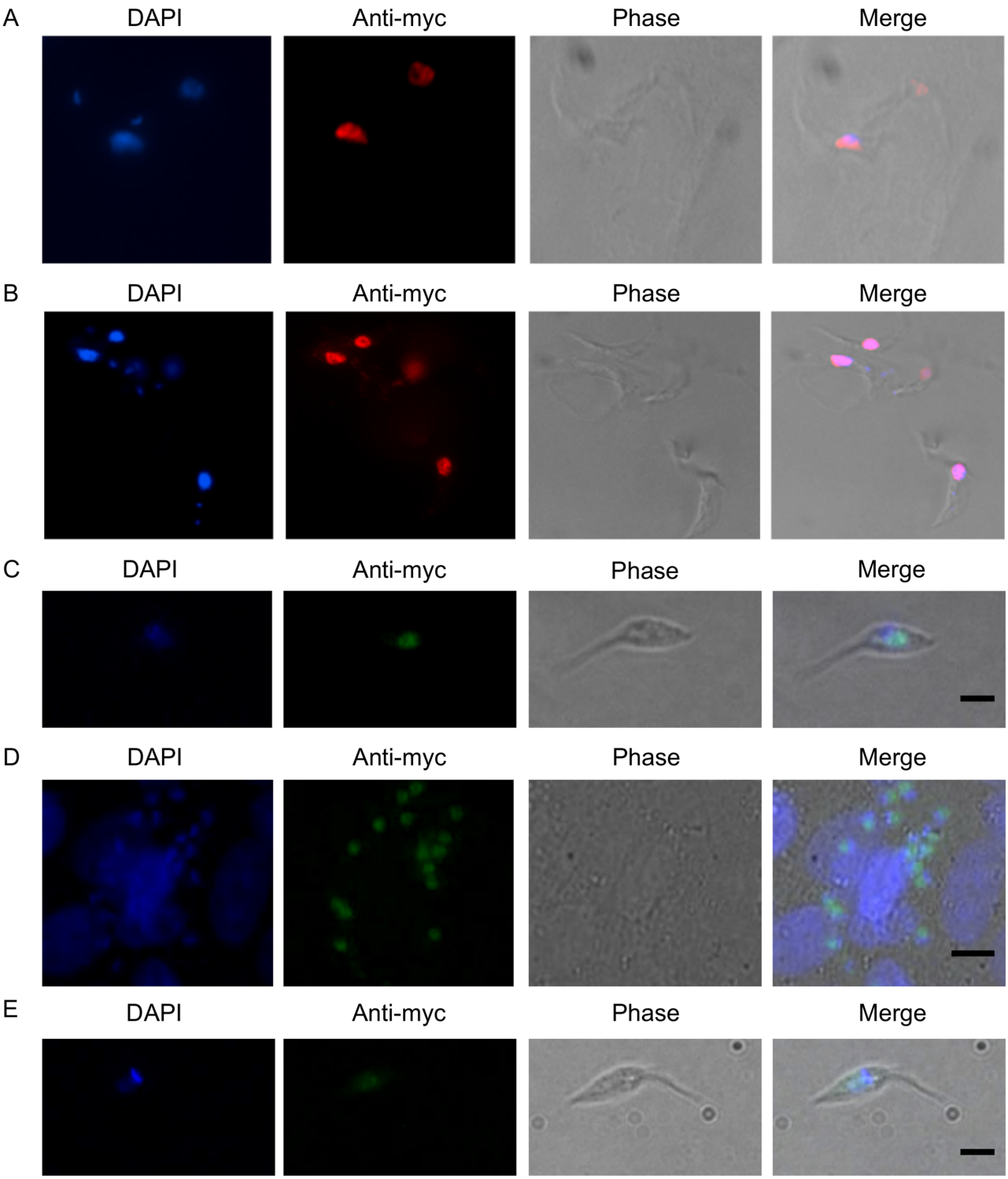


Fig 7. MSH2 displays nuclear localisation in *T. brucei* and *T. cruzi*. Parasites expressing MSH2 C-terminally fused to 12 copies of the MYC epitope were used for immunolocalization of MSH2 using anti-MYC antiserum. (**A**) Transfected *T. brucei* bloodstream forms, (**B**) *T. brucei* procyclic forms, (**C**) *T. cruzi* epimastigotes, (**D**) *T. cruzi* intracellular amastigote cells inside infected Vero cels and (**E**) *T. cruzi* epimastigotes after 20 min treatment with 70μM H_2O_2 are shown. Representive images of DAPI staining of DNA, immunoflourescence with anti-MYC antiserum and phase contrast images of parasite cells are shown together with merged images. (Bars = 2.3 μm).

doi:10.1371/journal.pntd.0003870.g007

signal. The same nuclear localization was found in *T. cruzi* epimastigotes expressing MSH2:myc, as well as in amastigotes obtained after infection of Vero cells (Fig 7C and 7D). No changes in subcellular localization of the tagged MSH2 protein were observed in *T. cruzi* epimastigotes expressing MSH2:myc after exposure to H_2O_2 (Fig 7E) or other genotoxic agents, such as MNNG and cisplatin.

Discussion

In previous studies we have described the phenotypic effects of deleting both alleles of *MSH2* or *MLH1* in *T. brucei* BSF cells, and the effects of loss of a single allele of *MSH2* in *T. cruzi* epimastigotes [21, 37]. Here, we provide several new insights into the function of MMR in African and American trypanosomes. First, we show that genetic ablation of MSH2 or MLH1 is possible in *T. brucei* PCF cells, as is MSH2 ablation in *T. cruzi* epimastigotes. In all cases, loss of MSH2 results in detectable impairment in MMR, as demonstrated by the increased tolerance to the alkylator MNNG, a phenotype specifically seen in MMR mutants in other eukaryotes [55] and in *T. brucei* BSF cells [21]. Second, we reveal a striking life cycle dependent difference in the effect of MSH2 ablation in *T. brucei*: in PCF cells loss of MSH2 results in increased tolerance to H_2O_2, whereas MSH2 loss results in increased sensitivity in BSF cells [38]. The same increased tolerance is also seen in *T. cruzi* epimastigote MSH2 mutants, where it impacts on the capacity of the parasite to grow in ROS-producing host macrophages. Importantly, altered H_2O_2 resistance was not observed when *T. brucei* BSF or PCF cells lacking MLH1 were examined. Finally, we provide evidence that the increased resistance to H_2O_2 in *T. brucei* after loss of MSH2 is due to a life cycle dependent adaptation in a facet of the cell that is distinct from MSH2, since re-expression of the protein restores MMR activity in PCF cells but does not alter the response to H_2O_2. In contrast, re-expression of MSH2 in *T. brucei* BSF *msh2*-/- mutants reverts both MMR impairment and H_2O_2 sensitivity.

Despite the complexity of phenotypes observed after MMR mutation, the findings indicate a common function of MSH2 in both trypanosomes: in addition to its role as a key component of MMR, MSH2 is also directly involved in the response to oxidative stress. Since loss of MLH1 did not result in increased resistance to H_2O_2 in PCF *T. brucei*, our new data confirms previous indications from *BSF T. brucei* [38] that although MSH2 acts in the parasite's response to oxidative stress, such a role is unlikely to involve execution of MMR on oxidative lesions through MLH1-directed functions. Indeed, this is supported by the observation that PCF *T. brucei* MSH2 mutants, but not MLH1 mutants, display increased levels of 8-oxoG, a known form of oxidized base damage [56], in their nuclear and mitochondrial genomes. The same accumulation of 8-oxoG is also seen in *T. cruzi msh2*-/- and *msh2*+/- mutants [37], indicating that such a role for MSH2 is conserved in the two trypanosomes species. Most likely, a separation of function between MSH2 and MLH1 in this role will also be found in *T. cruzi*, though this has not to date been tested. The nature of MSH2's role in responding the oxidative damage remains unclear, including whether or not it is limited to acting upon or repairing 8-oxoG. One possibility is that MSH2 acts in conjunction with MSH6 to repair 8-oxoG in DNA, a known activity of this heterodimer in other eukaryotes that can act independently of downstream MMR components [32]. However, we also observe accumulation of 8-oxoG in the kDNA of *T. brucei* and *T. cruzi* MSH2 mutants, consistent with previous descriptions of kDNA loss in *T. brucei* BSF *msh2*-/- mutants [37], and it is not clear that MSH2-6 could direct such a repair role in the mitochondrion. A broader role for MSH2 in the oxidative stress response might therefore need to be considered, perhaps related to findings in other eukaryotes that MSH2-6 can act to signal the presence of various forms of DNA damage, for instance through ATR [57–59]. It remains puzzling, however, that much of the signaling and wider activities attributed to MSH2-6 in

other eukaryotes appear to reside in the extended N-terminal domain of MSH6 [59], which is notably truncated in trypanosomatid MSH6 orthologues [21]. Nonetheless, such a role for MSH2 perhaps most readily explains the adaptation we propose in *T. brucei* PCF, but not in BSF cells after loss of MSH2. PCF *T. brucei* have active mitochondrial metabolism, unlike BSF, and therefore greater levels of endogenous ROS, meaning that loss of MSH2 may be more detrimental in this life cycle stage [39]. *T. cruzi* epimastigotes also have an aerobic metabolism relying on mitochondrial respiration [60], and it is thus tempting to speculate that the same adaptation most likely occurred during the generation of *msh2* null mutants in *T. cruzi* epimastigotes; though we have no direct evidence for such adaptation, the selection of cells lacking both alleles was notably problematic and necessitated an altered targeting transfection approach for removing the second allele.

To date, our analysis of the consequences of *T. brucei* MMR mutation have only been conducted *in vitro*, meaning it remains possible that the life cycle differences, and in particular the proposed PCF adaptation to MSH2 loss, are due to culture conditions rather than environmental and metabolic changes as the parasite cycles between host and vector. However, we provide direct evidence that the increased capacity to survive oxidative stress observed in *T. cruzi msh2* -/- mutants may reflect challenges faced by this parasite during its life cycle. Although no difference in infectivity was observed between *T. cruzi* WT cells and *msh2-/-* mutants in Vero cells, macrophages infected with *T. cruzi msh2-/-* mutants contained almost 3-fold more intracellular amastigotes than macrophages infected with WT parasites. Due to their phagocytic nature, macrophages naturally produce ROS through the activation of NADPH oxidase during phagocytosis or by stimulation with a wide range of infective agents [61]. Although ROS are expected to be involved in pathogen elimination, increasing evidence suggests that ROS production actually could enhance *T. cruzi* infection in macrophages. For instance, it was recently proposed that oxidative stress mobilizes cellular iron and fuels *T. cruzi* infection [62, 63]. A role for ROS as a signalling molecule has also been highlighted in studies with *Leishmania*, where low ROS concentrations regulate proliferation and differentiation by modulating the activity of cellular targets by oxidation [64]. It seems reasonable to assume that MSH2 is part of the arsenal of functions that trypanosomatid parasites are equipped with to withstand and detect oxidative stress during their natural life cycles, and the absence of MSH2 can have wider effects than simply loss of MMR, as reflected in the adaptation we suggest in PCF *T. brucei*.

What is the nature of the adaptation following MSH2 mutation? Answering this question is complicated by the multiple potential pathways that might be affected. One possibility is that loss of MSH2 necessitates the up-regulation of an alternative repair pathway, such as base excision repair (BER). BER may be an attractive option because it is known to respond to oxidative stress and, indeed, a DNA glycosylase termed OGG1 is found in many organisms [65–67], including *T. cruzi* [68], that acts on 8-oxoG. However, increased BER activity seems incompatible with the increased levels of 8 oxoG we detect in *T. brucei* and *T. cruzi* MSH2 mutants. These data indicate that increased oxidative damage to nucleic acids occurs in the mutants and therefore suggests that the cells might adapt by limiting their exposure to oxidative stress in other ways. Trypanosomes have a complex set of enzymes involved in the oxidative stress response. One such pathway distinct from the mammalian host is based on trypanothione metabolism [69]. A paradox in our study is that we can only find evidence for a nuclear localization of MSH2, even after exposure to H_2O_2. Most oxidative damage is likely to occur in the trypanosome mitochondrion, as this is the major source of ROS. However, if MSH2 is limited to the nucleus, then how does loss of MSH2 result in (as noted above) increased levels of 8 oxoG in the kDNA? Moreover, if even some of the adaptation we see after loss of MSH2 affects trypanothione metabolism, then how is the loss of a nuclear protein communicated to these enzymes, which are thought to be mitochondrial or cytoplasmic

[70–74]? One possibility is that C-terminal tagging impairs mitochondrial localization or MSH2 function. In BSF cells, we can rule this out because MSH2-myc was shown to be functional in the response to MNNG treatment (S9 Fig). However, the same analysis has not been conducted in PCF *T. brucei*, where perhaps mitochondrial localization is more important or pronounced. An alternative explanation is that trypanosome MSH2, perhaps in conjunction with MSH6, does indeed provide a role in signaling damage, similar to the activities detailed in other eukaryotes. Whether such signaling is limited to oxidative damage is unknown, but the signal provided by MSH2 may be communicated, in ways still to be determined, beyond the nucleus. Hence, if MSH2 is ablated, this element of the signaling cascade is lost. In the insect stages of at least *T. brucei* this loss is more deleterious than in the mammal, necessitating the selection for metabolic adaptation to deal with an altered oxidative stress response, with the consequence that the mutant becomes more resistant to ROS. The same hypothesis applies to *T. cruzi* since similar phenotypic changes were also seen in *T. cruzi* epimastigote *MSH2* null mutants.

Clearly, further studies will be needed to understand how the parasites adapt to MSH2 mutation and it may be that metabolomic or proteomic approaches are the best strategies to take, in particular if no compensatory genetic changes follow *MSH2* mutation. Nonetheless, this work reveals surprising complexity in the outcome of mutation to a core DNA repair pathway, suggesting interconnections with other cellular pathways. In addition, this study potentially reveals life cycle-dependent differences in MMR function. Loss of BRCA2 has also been shown to have different effects on genome stability in *T. brucei* BSF and PCF cells [75], but the extent to which the wide range of DNA repair pathways in trypanosomatids can vary in their activity or use through the life cycle remains little explored.

Supporting Information

S1 Fig. Strategy to knockout *MSH2* or *MLH1* in *T. brucei* and *T. cruzi*. (**A**) *T.brucei (Tb) MSH2* or *MLH1* genes were deleted by replacement of the coding sequence (CDS) of the gene with a DNA construct that consisted of Puromycin (PUR^R) or Blasticidin (BSD^R) resistance genes flanked by processing sequences (providing signals for splicing and poliadenylation) derived from the αβ tubulin intergenic regions. Homologous integration was guided by 5' and 3' UTR sequences of either gene that surrounded the antibiotic resistance cassettes. The two alleles of *T.cruzi MSH2* were each deleted by homologous recombination using different DNA constructs. The first allele was deleted by using 5' and 3' UTR sequences to guide integration of the CDS for the Hygromycin resistance gene ($Hygro^R$); in this case, splicing and polyadenylation of the resistance gene is assumed to be derived from endogenous MSH2 processing signals. For the second allele, the CDS was not deleted in its entirety, but instead it is was partly deleted by a construction containing a Neomycin resistance gene (Neo^R) flanked by splicing and polyadenylation signal sequences derived from *HX1* and *GAPDH* intergenic regions containing signals for splicing and poliadenylation. Integration of the resistance cassette here is guided by 5' and 3' *MSH2* CDS sequence. (**B**) A PCR screen to identify double knockout clones (-/-) in which both alleles of *TcMSH2* have been targeted was conducted with specific primers annealing in the $Hygro^R$ or Neo^R resistance genes together with common primers that recognised sequences that flanked the MSH2 fragment included in the the constructs. An agarose gel is shown of the PCR products generated using genomic DNA from *T. cruzi* wild type cells (WT), first allele mutant clones (cl1 and cl2 +/-) in which $Hygro^R$ has been integrated, or double allele mutants (cl1 and cl2 -/-) in which both $Hygro^R$ and Neo^R have integrated. c- indicates a control reaction without any input genomic DNA.
(TIF)

S2 Fig. Assessing the integration of DNA constructions to delete both TbMSH2 and TbMLH1 alleles. PCR amplifications were carried out to verify the knockout of both *TbMSH2* **(A)** or *TbMLH1* alleles **(B)** using specific primers annealing in the target gene or the PUR^R or BSD^R resistance genes together with common primers that recognised sequences that flanked the MSH2 or MLH1 fragment included in the the constructs. Arrows shown in the above panels denote regions of the wild type or mutated loci complementary to the different primers. PCR products generated using genomic DNA from *T. brucei* wild type cells (WT), PUR mutant clones (*Tbmsh2*/*Tbmlh1* +/-) in which PUR^R has been integrated, BSD mutant clones (*Tbmsh2*/*Tbmlh1* +/-) in which BSD^R has been integrated or double allele mutants (*Tbmsh2*/*Tbmlh1*-/-) in which both PUR^R and BSD^R have integrated are shown after separation on agarose gels.
(TIF)

S3 Fig. Wild type *T. cruzi* epimastigotes and MSH2 knockout mutants have no difference in cell growth *in vitro*. WT *T. cruzi* epimastigote and two clonal cell lines with one (*Tcmsh2* +/-) or both *msh2* alleles disrupted (*Tcmsh2*-/-) were diluted in LIT medium to $1x10^7$ parasites. mL^{-1} and grown for additional 3 days. Cell densities were measured at 24 hours intervals; bars indicate standard deviation.
(TIF)

S4 Fig. Microsatellite instability in *T. brucei* MMR knockouts. PCR amplification of the microsatellite locus JS2 from PCF WT, *Tbmsh2*+/-, *Tbmsh2*-/-, *Tbmlh1*+/-, and *Tbmlh1*-/- grown in the absence (-) and presence (+) of 20μM H_2O_2 for 48 hours and then cloned by limiting dilution in 96 well culture dishes. The JS2 locus was amplified from 10 clones from each cell line using primers JS2A and JS2B [21]. PCR products were separated on 3% agarose gesl; note, the two alleles of this JS2 locus have distinct sizes. PCR product from one of the wild type sub clones was also added in the first and last lane parallel to the mutants, for size comparison. Clones that show a difference in size relative to WT are indicated by an arrow; size markers are shown.
(TIF)

S5 Fig. MSH2 knockout mutants in *T. brucei* are more resistant to oxidative stress generated by H_2O_2 at different time points. *T. brucei* wild type (WT), *msh2*+/-, *msh2*-/-, *mlh1*+/- and *mlh1*-/- procyclic form cells were grown in culture medium with 0 μM, 10 μM or 20 μM H_2O_2. Cell density was measured after 24 and 72 hours and plotted as the percentage survival of the H_2O_2 treated cells relative to untreated; vertical lines show standard deviation. $^{***}p<0.001$, $^{**}p<0.001$, difference between mutants relative to wild type.
(TIF)

S6 Fig. Reintegration of *MSH2* in *T. brucei* procyclic form (PCF) *msh2*-/- mutants. The upper diagram shows that the gene knockout strategy deletes the entire Tb*MSH2* ORF and indicates the position of primers ('ORF') used to test for the presence or absence of *MSH2* ORF in genomic DNA of wild type (WT) cells, *Tbmsh2*+/- and *Tbmsh2*-/- mutants, and in three PCF *Tbmsh2*-/-/+ clones (1–3) in which the *MSH2* ORF was reintegrated into the endogenous locus of the-/- mutant using a construct described previously [21]. The lower diagram shows two agarose gels, the uppermost displaying PCR products generated using the ORF primers and the different cells, relative to a control PCR (lower gel) in which the unaltered *MSH2* 5' UTR was PCR-amplified ('UTR'); size markers are shown (kb).
(TIF)

S7 Fig. Analysis of JS2 microsatellite instability in *T. brucei* PCF cells in the presence or absence of of 20 μM H_2O_2. WT, *Tbmsh2*+/-, *Tbmsh2*-/- and *Tbmsh2*-/-/+ cells were grown in the absence (-) or presence (+) of 20 μM H_2O_2 for 48 hours and then cloned by limiting dilution in 96 well culture dishes. The JS2 locus was amplified from 10 clones from each cell line using primers JS2A and JS2B [21] and PCR products were separated on 3% agarose gel; note, the two alleles of the JS2 locus are distinct sizes and are marked by a dashed red line ('c' indicates a control PCR reaction run without genomic DNA). PCR product from one of the untreated wild type sub clones (wt-) was added in the first and last lane of the gels showing the mutants, for size comparison. Clones that show a difference in size relative to WT are indicated by an arrow; size markers are shown (bp).
(TIF)

S8 Fig. RNAi of MSH2 in *T. brucei* PCF. (A) Growth curve of *T. brucei* PCF cells in which RNAi against MSH2 was induced by the presence of tetracycline (Tet+) (2 $\mu g.ml^{-1}$) Cell density was measured every 24 hours over a period of 216 hours and compared between the Tet+ cells and PCF cells grown in the absence of tetracycline (Tet-).; the cultures were diluted to their starting density every 72 hours. The graph shows the average cell density of two independent clones, repeated twice; vertical lines indicate standard error. $P<0.001$ **(B)** mRNA levels of MSH2 and MLH1 were determined in one cloned *T. brucei* PCF cell line before and after RNAi induction by quantitative reverse-transcriptase PCR. Total RNA extracted from RNAi-induced (Tet+) and non-induced (Tet-) *T. brucei* PCF cells was reverse transcribed and quantified using GPI8 mRNA as an endogenous control. Error bars are standard deviations for four replicates. $^{***}P<0.001$
(TIF)

S9 Fig. Parasites expressing MSH2:c-myc have a functional protein. *T. brucei* BSF *Tbmsh2* +/- were transfected to express MSH2 C-terminally fused to a c-myc tag (*Tbmsh2*:myc) and the MMR efficiency was compared in these cells to *T. brucei* wild type (WT), *Tbmsh2*+/- and *Tbmsh2*-/- cells after treatment with MNNG. Cells were grown at a starting density of 1 x 10^5 $cells.ml^{-1}$ in the presence of increasing concentrations of MNNG (from 0.39 μM—400 μM) in fluorescence-readable 96 well plates. After 48 hours, Alamar Blue was added to each well and fluorescence was measured after a further 24 hours of growth. IC50 values were determined and are shown as the mean of three experiments, with standard deviations indicated by vertical bars.
(TIF)

Acknowledgments

The authors would like to thank Wanderson daRocha for providing plasmid constructs and Craig Lapsley for technical support. This paper is dedicated to the memory of our colleague Juliano Leal de Paula, who performed sequence analyses of plasmid constructs.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VGS CRM RM SMRT. Performed the experiments: VGS TFZ JB PCC JBM CLA. Analyzed the data: VGS TFZ PCC CRM RM SMRT. Contributed reagents/materials/analysis tools: CRM RM SMRT. Wrote the paper: VGS RM SMRT.

References

1. Chagas C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. 1909.

2. Brun R, Blum J, Chappuis F, Burri C. Human African trypanosomiasis. Lancet. 2010; 375(9709):148–59. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60829-1 PMID: 19833383
3. Ooi CP, Bastin P. More than meets the eye: understanding Trypanosoma brucei morphology in the tsetse. Front Cell Infect Microbiol. 2013; 3:71. doi: 10.3389/fcimb.2013.00071 PMID: 24312899
4. Portman N, Gull K. Identification of paralogous life-cycle stage specific cytoskeletal proteins in the parasite Trypanosoma brucei. PLoS One. 2014; 9(9):e106777. doi: 10.1371/journal.pone.0106777 PMID: 25180513
5. Walker DM, Oghumu S, Gupta G, McGwire BS, Drew ME, Satoskar AR. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. Cell Mol Life Sci. 2014; 71(7):1245–63. doi: 10.1007/s00018-013-1491-1 PMID: 24221133
6. Piacenza L, Alvarez MN, Peluffo G, Radi R. Fighting the oxidative assault: the Trypanosoma cruzi journey to infection. Curr Opin Microbiol. 2009; 12(4):415–21. doi: 10.1016/j.mib.2009.06.011 PMID: 19616990
7. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. J Biol Chem. 2013; 288(37):26464–72. doi: 10.1074/jbc.R113.472936 PMID: 23861390
8. Hao Z, Kasumba I, Aksoy S. Proventriculus (cardia) plays a crucial role in immunity in tsetse fly (Diptera: Glossinidiae). Insect Biochem Mol Biol. 2003; 33(11):1155–64. PMID: 14563366
9. Munks RJ, Sant'Anna MR, Grail W, Gibson W, Igglesden T, Yoshiyama M, et al. Antioxidant gene expression in the blood-feeding fly Glossina morsitans morsitans. Insect Mol Biol. 2005; 14(5):483–91. PMID: 16164604
10. Passos-Silva DG, Rajão MA, Nascimento de Aguiar PH, Vieira-da-Rocha JP, Machado CR, Furtado C. Overview of DNA Repair in Trypanosoma cruzi, Trypanosoma brucei, and Leishmania major. J Nucleic Acids. 2010; 2010:840768. doi: 10.4061/2010/840768 PMID: 20976268
11. Genois MM, Paquet ER, Laffitte MC, Maity R, Rodrigue A, Ouellette M, et al. DNA repair pathways in trypanosomatids: from DNA repair to drug resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2014; 78(1):40–73. doi: 10.1128/MMBR.00045-13 PMID: 24600040
12. Peña-Diaz J, Jiricny J. Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone? Trends Biochem Sci. 2012; 37(5):206–14. doi: 10.1016/j.tibs.2012.03.001 PMID: 22475811
13. Clark N, Wu X, Her C. MutS Homologues hMSH4 and hMSH5: Genetic Variations, Functions, and Implications in Human Diseases. Curr Genomics. 2013; 14(2):81–90. doi: 10.2174/1389202911314020002 PMID: 24082819
14. Guarné A. The functions of MutL in mismatch repair: the power of multitasking. Prog Mol Biol Transl Sci. 2012; 110:41–70. doi: 10.1016/B978-0-12-387665-2.00003-1 PMID: 22749142
15. Erie DA, Weninger KR. Single molecule studies of DNA mismatch repair. DNA Repair (Amst). 2014; 20:71–81. doi: 10.1016/j.dnarep.2014.03.007 PMID: 24746644
16. Pillon MC, Miller JH, Guarné A. The endonuclease domain of MutL interacts with the β sliding clamp. DNA Repair (Amst). 2011; 10(1):87–93.
17. Glickman BW, Radman M. Escherichia coli mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch correction. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980; 77(2):1063–7. PMID: 6987663
18. Ji HP, Morales S, Welch K, Yuen C, Farnam K, Ford JM. Identification of a novel deletion mutant strain in Saccharomyces cerevisiae that results in a microsatellite instability phenotype. Biodiscovery. 2012; (1:). PMID: 23667739
19. Denver DR, Feinberg S, Steding C, Durbin M, Lynch M. The relative roles of three DNA repair pathways in preventing Caenorhabditis elegans mutation accumulation. Genetics. 2006; 174(1):57–65. PMID: 16783005
20. Denver DR, Feinberg S, Estes S, Thomas WK, Lynch M. Mutation rates, spectra and hotspots in mismatch repair-deficient Caenorhabditis elegans. Genetics. 2005; 170(1):107–13. PMID: 15716493
21. Bell JS, Harvey TI, Sims AM, McCulloch R. Characterization of components of the mismatch repair machinery in Trypanosoma brucei. Mol Microbiol. 2004; 51(1):159–73.. PMID: 14651619
22. Scherer SJ, Avdievich E, Edelmann W. Functional consequences of DNA mismatch repair missense mutations in murine models and their impact on cancer predisposition. Biochem Soc Trans. 2005; 33 (Pt 4):689–93. PMID: 16042575
23. Bridge G, Rashid S, Martin SA. DNA mismatch repair and oxidative DNA damage: implications for cancer biology and treatment. Cancers (Basel). 2014; 6(3):1597–614. doi: 10.3390/cancers6031597 PMID: 25099886
24. Iyama T, Wilson DM. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. DNA Repair (Amst). 2013; 12(8):620–36. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.04.015 PMID: 23684800

25. Schofield MJ, Hsieh P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. Annu Rev Microbiol. 2003; 57:579–608. PMID: 14527292

26. de Wind N, Dekker M, Berns A, Radman M, te Riele H. Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. Cell. 1995; 82(2):321–30. PMID: 7628020

27. Nowosielska A, Marinus MG. DNA mismatch repair-induced double-strand breaks. DNA Repair (Amst). 2008; 7(1):48–56. PMID: 17827074

28. Imlay JA, Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. Science. 1988; 240(4857):1302–9. PMID: 3287616

29. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochem J. 1996; 313 (Pt 1):17–29. PMID: 8546679

30. Wyrzykowski J, Volkert MR. The Escherichia coli methyl-directed mismatch repair system repairs base pairs containing oxidative lesions. J Bacteriol. 2003; 185(5):1701–4. PMID: 12591888

31. Ni TT, Marsischky GT, Kolodner RD. MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxo-guanine in S. cerevisiae. Mol Cell. 1999; 4(3):439–44. PMID: 10518225

32. Zlatanou A, Despras E, Braz-Petta T, Boubakour-Azzouz I, Pouvelle C, Stewart GS, et al. The hMsh2-hMsh6 complex acts in concert with monoubiquitinated PCNA and Pol η in response to oxidative DNA damage in human cells. Mol Cell. 2011; 43(4):649–62. doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.023 PMID: 21855803

33. Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, et al. The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei. Science. 2005; 309(5733):416–22. PMID: 16020726

34. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, et al. The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease. Science. 2005; 309(5733):409–15. PMID: 16020725

35. Bell JS, McCulloch R. Mismatch repair regulates homologous recombination, but has little influence on antigenic variation, in Trypanosoma brucei. J Biol Chem. 2003; 278(46):45182–8. PMID: 12933800

36. Barnes RL, McCulloch R. Trypanosoma brucei homologous recombination is dependent on substrate length and homology, though displays a differential dependence on mismatch repair as substrate length decreases. Nucleic Acids Res. 2007; 35(10):3478–93. PMID: 17478508

37. Campos PC, Silva VG, Furtado C, Machado-Silva A, Darocha WD, Peloso EF, et al. Trypanosoma cruzi MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response. Mol Biochem Parasitol. 2011; 176(1):8–16. doi: 10.1016/j.molbiopara.2010.11.001 PMID: 21073906

38. Machado-Silva A, Teixeira SM, Franco GR, Macedo AM, Pena SD, McCulloch R, et al. Mismatch repair in Trypanosoma brucei: heterologous expression of MSH2 from Trypanosoma cruzi provides new insights into the response to oxidative damage. Gene. 2008; 411(1–2):19–26. doi: 10.1016/j.gene.2008.01.010 PMID: 18281162

39. Bringaud F, Rivière L, Coustou V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. Mol Biochem Parasitol. 2006; 149(1):1–9. PMID: 16682088

40. Paes LS, Suárez Mantilla B, Zimbres FM, Pral EM, Diogo de Melo P, Tahara EB, et al. Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in Trypanosoma cruzi. PLoS One. 2013; 8(7):e69419. doi: 10.1371/journal.pone.0069419 PMID: 23894476

41. CAMARGO EP. GROWTH AND DIFFERENTIATION IN TRYPANOSOMA CRUZI. I. ORIGIN OF METACYCLIC TRYPANOSOMES IN LIQUID MEDIA. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1964; 6:93–100. PMID: 14177814

42. DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, et al. Expression of exogenous genes in Trypanosoma cruzi: improving vectors and electroporation protocols. Parasitology research. 2004; 92(2):113–20. PMID: 14634799

43. Wang Z, Morris JC, Drew ME, Englund PT. Inhibition of Trypanosoma brucei gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. J Biol Chem. 2000; 275(51):40174–9. PMID: 11013266

44. Wirtz E, Leal S, Ochatt C, Cross GA. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in Trypanosoma brucei. Mol Biochem Parasitol. 1999; 99(1):89–101. PMID: 10215027

45. Teixeira SM, Kirchhoff LV, Donelson JE. Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of Trypanosoma cruzi. The Journal of biological chemistry. 1995; 270(38):22586–94. PMID: 7673251

46. Hope M, MacLeod A, Leech V, Melville S, Sasse J, Tait A, et al. Analysis of ploidy (in megabase chromosomes) in Trypanosoma brucei after genetic exchange. Mol Biochem Parasitol. 1999; 104(1):1–9. PMID: 10589977

47. Struthers L, Patel R, Clark J, Thomas S. Direct detection of 8-oxodeoxyguanosine and 8-oxoguanine by avidin and its analogues. Anal Biochem. 1998; 255(1):20–31. PMID: 9448838

48. Maynard S, de Souza-Pinto NC, Scheibye-Knudsen M, Bohr VA. Mitochondrial base excision repair assays. Methods. 2010; 51(4):416–25. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.02.020 PMID: 20188838

49. Furtado C, Kunrath-Lima M, Rajão MA, Mendes IC, de Moura MB, Campos PC, et al. Functional characterization of 8-oxoguanine DNA glycosylase of Trypanosoma cruzi. PLoS One. 2012; 7(8):e42484. doi: 10.1371/journal.pone.0042484 PMID: 22876325

50. Schamber-Reis BL, Nardelli S, Régis-Silva CG, Campos PC, Cerqueira PG, Lima SA, et al. DNA polymerase beta from Trypanosoma cruzi is involved in kinetoplast DNA replication and repair of oxidative lesions. Mol Biochem Parasitol. 2012; 183(2):122–31. doi: 10.1016/j.molbiopara.2012.02.007 PMID: 22369885

51. Alsford S, Horn D. Single-locus targeting constructs for reliable regulated RNAi and transgene expression in Trypanosoma brucei. Mol Biochem Parasitol. 2008; 161(1):76–9. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.05.006 PMID: 18588918

52. Ben-Dov CP, Levin MJ, Vázquez MP. Analysis of the highly efficient pre-mRNA processing region HX1 of Trypanosoma cruzi. Mol Biochem Parasitol. 2005; 140(1):97–105. PMID: 15694491

53. Kaniak A, Dzierzbicki P, Rogowska AT, Malc E, Fikus M, Ciesla Z. Msh1p counteracts oxidative lesion-induced instability of mtDNA and stimulates mitochondrial recombination in Saccharomyces cerevisiae. DNA Repair (Amst). 2009; 8(3):318–29. doi: 10.1016/j.dnarep.2008.11.004 PMID: 19056520

54. Pogorzala L, Mookerjee S, Sia EA. Evidence that msh1p plays multiple roles in mitochondrial base excision repair. Genetics. 2009; 182(3):699–709. doi: 10.1534/genetics.109.103796 PMID: 19398768

55. Wyatt MD, Pittman DL. Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. Chem Res Toxicol. 2006; 19(12):1580–94. PMID: 17173371

56. van Loon B, Markkanen E, Hübscher U. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. DNA Repair (Amst). 2010; 9(6):604–16. doi: 10.1016/j.dnarep.2010.03.004 PMID: 20399712

57. Yoshioka K, Yoshioka Y, Hsieh P. ATR kinase activation mediated by MutSalpha and MutLalpha in response to cytotoxic O6-methylguanine adducts. Mol Cell. 2006; 22(4):501–10. PMID: 16713580

58. Negureanu L, Salsbury FR. The molecular origin of the MMR-dependent apoptosis pathway from dynamics analysis of MutSα-DNA complexes. J Biomol Struct Dyn. 2012; 30(3):347–61. doi: 10.1080/07391102.2012.680034 PMID: 22712459

59. Edelbrock MA, Kaliyaperumal S, Williams KJ. Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities. Mutat Res. 2013; 743–744:53–66. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.04.009 PMID: 23688353

60. Gonçalves RL, Barreto RF, Polycarpo CR, Gadelha FR, Castro SL, Oliveira MF. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. J Bioenerg Biomembr. 2011; 43(6):651–61. doi: 10.1007/s10863-011-9398-8 PMID: 22081211

61. Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. Am J Respir Crit Care Med. 2002; 166(12 Pt 2):S4–8. PMID: 12471082

62. Paiva CN, Feijó DF, Dutra FF, Carneiro VC, Freitas GB, Alves LS, et al. Oxidative stress fuels Trypanosoma cruzi infection in mice. J Clin Invest. 2012; 122(7):2531–42. doi: 10.1172/JCI58525 PMID: 22728935

63. Paiva CN, Bozza MT. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? Antioxid Redox Signal. 2014; 20(6):1000–37. doi: 10.1089/ars.2013.5447 PMID: 23992156

64. Mittra B, Andrews NW. IRONy OF FATE: role of iron-mediated ROS in Leishmania differentiation. Trends in parasitology. 2013; 29(10):489–96. Epub 2013/08/21. doi: 10.1016/j.pt.2013.07.007 PMID: 23948431

65. Klungland A, Bjelland S. Oxidative damage to purines in DNA: role of mammalian Ogg1. DNA Repair (Amst). 2007; 6(4):481–8. PMID: 17127104

66. Sampath H. Oxidative DNA damage in disease—insights gained from base excision repair glycosylase-deficient mouse models. Environ Mol Mutagen. 2014; 55(9):689–703. doi: 10.1002/em.21886 PMID: 25044514

67. Le Page F, Klungland A, Barnes DE, Sarasin A, Boiteux S. Transcription coupled repair of 8-oxoguanine in murine cells: the ogg1 protein is required for repair in nontranscribed sequences but not in transcribed sequences. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97(15):8397–402. PMID: 10890888

68. Furtado C, Kunrath-Lima M, Rajao MA, Mendes IC, de Moura MB, Campos PC, et al. Functional characterization of 8-oxoguanine DNA glycosylase of Trypanosoma cruzi. PLoS One. 2012; 7(8):e42484. doi: 10.1371/journal.pone.0042484 PMID: 22876325

69. Krauth-Siegel RL, Comini MA. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. Biochim Biophys Acta. 2008; 1780(11):1236–48. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.03.006 PMID: 18395526

70. Dufernez F, Yernaux C, Gerbod D, Noël C, Chauvenet M, Wintjens R, et al. The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in trypanosomatidae: characterization, subcellular localization, and phylogenetic origin in Trypanosoma brucei. Free Radic Biol Med. 2006; 40(2):210–25. PMID: 16413404

71. Nogueira FB, Krieger MA, Nirdé P, Goldenberg S, Romanha AJ, Murta SM. Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in Trypanosoma cruzi population with in vitro-induced resistance to benznidazole. Acta Trop. 2006; 100(1–2):119–32. PMID: 17196920

72. Wilkinson SR, Meyer DJ, Taylor MC, Bromley EV, Miles MA, Kelly JM. The Trypanosoma cruzi enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. J Biol Chem. 2002; 277(19):17062–71. PMID: 11842085

73. Wilkinson SR, Temperton NJ, Mondragon A, Kelly JM. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in Trypanosoma cruzi. J Biol Chem. 2000; 275(11):8220–5. PMID: 10713147

74. Wilkinson SR, Obado SO, Mauricio IL, Kelly JM. Trypanosoma cruzi expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(21):13453–8. PMID: 12351682

75. Trenaman A, Hartley C, Prorocic M, Passos-Silva DG, van den Hoek M, Nechyporuk-Zloy V, et al. Trypanosoma brucei BRCA2 acts in a life cycle-specific genome stability process and dictates BRC repeat number-dependent RAD51 subnuclear dynamics. Nucleic Acids Res. 2013; 41(2):943–60. doi: 10.1093/nar/gks1192 PMID: 23222131

Anexo 2

Molecular & Biochemical Parasitology 176 (2011) 8–16

Contents lists available at ScienceDirect

Molecular & Biochemical Parasitology

Trypanosoma cruzi MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response☆

Priscila C. Campos[a], Viviane G. Silva[a], Carolina Furtado[a], Alice Machado-Silva[a], Wanderson D. DaRocha[a], Eduardo F. Peloso[b], Fernanda R. Gadelha[b], Marisa H.G. Medeiros[c], Gustavo de Carvalho Lana[d], Ying Chen[e], Rebecca L. Barnes[e], Danielle Gomes Passos-Silva[a], Richard McCulloch[e], Carlos Renato Machado[a], Santuza M.R. Teixeira[a,*]

[a] *Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*
[b] *Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil*
[c] *Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, SP, MG, Brazil*
[d] *Departamento de Estatística, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil*
[e] *Wellcome Centre for Molecular Parasitology, University of Glasgow, Glasgow, UK*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 April 2010
Received in revised form 24 October 2010
Accepted 1 November 2010
Available online 10 November 2010

Keywords:
Trypanosoma cruzi
DNA repair
MSH2
Oxidative stress
Trypanosoma brucei

ABSTRACT

Components of the DNA mismatch repair (MMR) pathway are major players in processes known to generate genetic diversity, such as mutagenesis and DNA recombination. *Trypanosoma cruzi*, the protozoan parasite that causes Chagas disease has a highly heterogeneous population, composed of a pool of strains with distinct characteristics. Studies with a number of molecular markers identified up to six groups in the *T. cruzi* population, which showed distinct levels of genetic variability. To investigate the molecular basis for such differences, we analyzed the *T. cruzi* MSH2 gene, which encodes a key component of MMR, and showed the existence of distinct isoforms of this protein. Here we compared cell survival rates after exposure to genotoxic agents and levels of oxidative stress-induced DNA in different parasite strains. Analyses of *msh2* mutants in both *T. cruzi* and *T. brucei* were also used to investigate the role of *Tcmsh2* in the response to various DNA damaging agents. The results suggest that the distinct MSH2 isoforms have differences in their activity. More importantly, they also indicate that, in addition to its role in MMR, TcMSH2 acts in the parasite response to oxidative stress through a novel mitochondrial function that may be conserved in *T. brucei*.

© 2010 Elsevier B.V. Open access under CC BY license.

1. Introduction

Trypanosoma cruzi is a protozoan parasite of great medical importance, since it causes Chagas' disease (or American Trypanosomiasis), a malady endemic throughout Latin America, with an estimated 50,000 deaths/year and 100 million people at risk (http://who.int/tdr/diseases/Chagas). *T. cruzi* belongs to the order Kinetoplastida, which is characterized by the presence of one flagellum and a single mitochondrion in which is situated the kinetoplast, a specialized DNA-containing organelle. Though separated by many millions of years of evolution, *T. cruzi* is related to another kinetoplastid parasite, *T. brucei* [1], which continues to afflict the economy and health of the people of sub-Saharan Africa.

T. cruzi has a heterogeneous population composed by a pool of strains that circulate in the domestic and sylvatic cycles involving humans, insect vectors and animal reservoirs. Based on studies with a number of molecular markers, the taxon was divided initially in two well-defined groups, so-called *T. cruzi* I and *T. cruzi* II lineages [2]. More recent studies proposed the existence of six discrete typing units named *T. cruzi* I to VI [3]. Although the *T. cruzi* population is predominantly clonal, a few hybrid lineages have been identified, including the clone CL Brener, chosen as the reference strain for the genome project [4].

Several reports highlighted the differential genetic diversity between *T. cruzi* I and II lineages and, more importantly, the intra-group variability observed within *T. cruzi* II. Phylogeny studies of DHFR-TS and TR sequences from 31 strains showed that all sequences from *T. cruzi* I strains are monophyletic, whereas sequences from *T. cruzi* II strains are paraphyletic and fall into 3 clades [5]. Analysis of *T. cruzi* multi-gene families showed that paralogous sequences encoding amastin, an amastigote surface glycoprotein, and TcAG48, an antigenic RNA binding protein, present higher intragenomic variability in *T. cruzi* II and CL Brener strains,

☆ Sequence data have been submitted to GenBank database under the accession number GQ869654.

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil. Tel.: +55 31 3409 2665; fax: +55 31 3409 2614.
E-mail address: santuzat@icb.ufmg.br (S.M.R. Teixeira).

0166-6851/© 2010 Elsevier B.V. Open access under CC BY license.
doi:10.1016/j.molbiopara.2010.11.001

when compared with *T. cruzi* I strains [6]. Likewise, whereas sequences encoding the Tc52 immuno-regulatory protein are homogeneous in strains belonging to the *T. cruzi* I lineage, they show higher sequence polymorphisms in *T. cruzi* II strains [7].

Components of DNA repair pathways are key players in the processes that result in changes in genetic variability within any cell population. Germline mutations in DNA mismatch repair (MMR) genes are associated with susceptibility to hereditary nonpolyposis colorectal human cancer (HNPCC) [8]. Mutator populations of bacteria, yeast and mammalian cells with defects in mismatch repair have also been described in isolates showing increased frequency of drug resistance [9–11]. Post-replicative DNA mismatch repair promotes genetic stability by repairing DNA replication errors, inhibiting recombination between non-identical DNA sequences and participating in responses to DNA damage induced by genotoxic agents, such as *N*-methyl-*N*′-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) and cisplatin [12,13]. MMR components are also involved in the response to oxidative lesions in DNA such as 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8oxoG) [14]. The initial steps of MMR are accomplished by heterodimers of MSH proteins, named MSH1 to MSH7 in eukaryotes. In *Saccharomyces cerevisiae,* the MSH2/MSH6 complex, or MutSα, recognizes nuclear base–base mismatches and small (1–2 bp) insertion–deletion (InDel) loops, while MSH2/MSH3 heterodimers, or MutSβ, recognizes a range of small and larger loop-outs. *S. cerevisiae* MSH1 protein is involved in mitochondrial genome stability [15].

TcMSH2 was the first component of the MMR machinery described in *T. cruzi* [16]. Analyses of the *TcMSH2* single copy gene present in different strains of the parasite demonstrated the existence of three isoforms of this protein, named MSH2A, B and C, which correlate with the division in three phylogenetic *T. cruzi* lineages [17]. A role of MMR in creating differences in genetic variability among *T. cruzi* strains was initially unveiled by studies showing that strains representative of *T. cruzi* II displayed allelic variation of nuclear microsatellite *loci* induced by hydrogen peroxide, the same not occurring in a strain belonging to the *T. cruzi* I lineage [18]. Moreover, parasites from MSH2 haplogroups B and C were more resistant to cisplatin treatment, as previously reported in other MMR-deficient cells [13]. These studies suggest that, at least under genotoxic stress conditions, strains belonging to the *T. cruzi* I lineage (presenting the A isoform of *TcMSH2* gene) have a more efficient MMR activity than *T. cruzi* II strains [18]. They also support the hypothesis that the distinct genetic diversity found in the two *T. cruzi* lineages might be consequence of different levels of MMR efficiency. Therefore, to better understand the mechanisms involved in generating genetic diversity in *T. cruzi* and, more precisely, the role of the MMR pathway, we investigated the response of DNA damaging agents in strains representative of the two main lineages and the activities of different isoforms of *T. cruzi* MSH2 proteins. Using gene deletion analysis to examine the response to oxidative damage, we uncovered a novel function for MSH2, related to mitochondrial DNA repair, which is conserved in both *T. cruzi* and *T. brucei*.

2. Materials and methods

2.1. Strains and growth conditions

Five cloned *T. cruzi* strains (Col1.7G2, Silvio X-10 cl1, Esmeraldo cl3, JG and CL Brener) were used. Genotyping of each strain using several markers demonstrated that Col1.7G2, Silvio X-10cl1 belong to *T. cruzi* I lineage whereas Esmeraldo cl3 and JG are representatives of *T. cruzi* II lineage [19]. CL Brener is a hybrid strain (*T. cruzi* II/III), reference for the genome sequencing project [4] and it was selected for the knockout experiments. Epimastigotes were maintained as described [20]. *T. brucei* wild type and *MSH2* deletion mutants were grown as previously described [21].

2.2. TcMSH2 amino acid sequence analysis and northern blot assays

TcMSH2 sequences from CL Brener were retrieved from GeneDB (accession numbers Tc00.1047053509643.80 and Tc00.1047053507711.320), whereas the Col1.7G2 sequence was obtained from a cloned PCR amplified fragment as described [22]. Deduced amino acid sequences were aligned using ClustalW version 1.8 and all protein sequences were run against the Pfam [23], Prosite [24] and InterPro [25] databases. For Northern blot analysis, total RNA (25 μg) was separated on formaldehyde agarose gels, blotted onto nylon membranes, cross-linked through UV irradiation and probed with [α-^{32}P] labeled *TcMSH2* as previously described [19]. The probe was labeled according to the Megaprime DNA labeling (GE Healthcare) protocol and the signals were quantified using the ImageJ program (http://rsbweb.nih.gov/ij/).

2.3. Treatment of the strains with genotoxic agents

Cultures with 10^7 parasites per mL were incubated in 24-well plates with different concentrations of MNNG (*N*-methyl-*N*′-nitro-*N*-nitrosoguanidine) (provided by Dr. Álvaro Augusto da Costa Leitão, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, RJ), cisplatin (Quiral Química do Brasil S/A), or H_2O_2 (Merck), in the presence or absence of 3 μM of the MMR inhibitor cadmium chloride, as indicated. Previous studies have shown a wide range for the H_2O_2 IC_{50} using various *T. cruzi* strains, varying from 98 to 190 μM [26,27]. After incubation for 3 or 5 days, cell densities were measured with a haematocytometer using Erythrosin B exclusion.

2.4. Measurement of 8-oxoguanine accumulation

Two different protocols were used to assess the 8-oxoG accumulation in *T. cruzi* DNA strains. In the *in situ* experiment, a protocol adapted from Struthers et al. [28] was used. Epimastigotes were incubated in the presence of 200 or 300 μM hydrogen peroxide for 20 min at 28 °C, washed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde. Aliquots (20 μL) of the cell suspension were distributed into wells of 8-wells chambered-slides. After 1 h of incubation at 4 °C, cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100, treated with 100 μg/mL RNase A and incubated with FITC-conjugated avidin (5 μg/mL final concentration) for 1 h at room temperature in the absence of light. After washing with PBS and mounted with a solution of 9:1 Glicerol:Tris–HCl, pH 9.0, the slides were visualized under a fluorescence microscope in a 100× oil immersion. Pre-incubation of FITC-conjugated avidin with 0.5 mM of 8oxodG results in 80% decrease in the fluorescence signal, whereas pre-incubation with dGTP has no significant effect on parasite labeling. Fluorescence intensities were averaged with the ImageJ program and plotted as fluorescence arbitrary units (average fluorescence intensity measured in 100 cells after subtracting the average background intensity). Background signals were measured in 100 fields, randomly chosen on the slides.

The 8-oxoG accumulation was also assessed by HPLC-electrochemical detection. Cells (10^9/mL) were treated with 20 mM H_2O_2 for 1 h at 28 °C, washed with PBS, and the DNA was isolated by the chaotropic NaI method [29] in the presence of 0.1 mM desferroxamine. DNA samples (100 μg) were treated with nuclease P_1 and alkaline phosphatase and analyzed by HPLC. Samples (100 μg) of digested DNA were injected into the HPLC/electrochemical detection system consisting of a Shimadzu model LC-10AD pump connected to a Luna C_{18} (Phenomenex, Torrance, CA, USA) reverse-phase column (250 mm × 4.6 mm ID, particle size 5 μm). The flow

rate of the isocratic eluent (50 mM potassium phosphate buffer, pH 5.5, and 8% methanol) was 1 mL/min. Coulometric detection was obtained with a Coulochem II detector (ESA, Chemsford, MA, USA). The potentials of the two electrodes were set at 120 and 280 mV. Elution of unmodified nucleosides was monitored simultaneously with a Shimadzu SPD-10A UV detector set at 254 nm. A Shimadzu Class-LC10 1.6 software was used to calculate the peak areas. The molar ratio of 8-oxodG to dG in each DNA sample was determined based on coulometric detection at 280 mV for 8-oxodG and on absorbance at 254 nm for dG in each injection.

2.5. Analysis of nuclear and mitochondrial genomes in T. brucei

T. brucei cultures were treated with H_2O_2 as described previously [22]. Paraformaldehyde-fixed cells were spotted onto microscope slides mounted with vectashield containing DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories Inc.). DNA configurations of the cells were analyzed, blind, by 2 researchers independently, and >500 cells were counted for each data point. Microscopic analysis was performed using an Axioskop 2 microscope (Zeiss) and images obtained using Openlab software (Improvision).

2.6. Analysis of oxidative metabolism

Epimastigotes were incubated for 18 h at 28 °C in a 96-well plate in the presence of 20 μL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (5.0 mg/mL MTT in PBS pH 7.6 as stock solution) and the final volume adjusted to 500 μL with culture medium. The reaction was stopped by the addition of 1.0 mL 0.04 N hydrochloric acid in 2-propanol. After 30 min, the lysate was vigorously mixed until completely homogenized. The supernatant was separated by centrifugation at 200 × *g* for 10 min and its absorbance was measured at 570 nm. NADPH production by the pentose phosphate pathway was measured as previously described [27].

2.7. Plasmid constructions and parasite transfections

The full-length *TcMSH2* gene was amplified from genomic DNA (CL Brener strain). The PCR was performed using primers forward and reverse carrying XbaI and NotI restriction sites, respectively, and amplicons were inserted into TOPO pCR4 (Invitrogen) generating the plasmid TOPO*TcMSH2*. Fragments containing the resistance genes hygromycin phosphotransferase (HYG) or neomycin phosphotransferase (NEO) were obtained after digestion of the pROCK-GFP-HYG or pROCK-GFP-NEO [30] with XhoI/NheI and ligated to TOPO*TcMSH2*, digested with the same enzymes. The resultant plasmids presenting each one of the resistance genes flanked by N and C-terminal fragments of *TcMSH2* coding sequence were used to delete the *TcMSH2* alleles by homologous recombination. Before the transfection, both plasmids (TOPO N-Neo-C and TOPO N-Hyg-C) were digested with XbaI and NotI and the respective 1.7 Kb and 1.9 Kb fragments were gel-purified. Approximately 50 μg of gel-purified fragments was used to transfect epimastigotes by electroporation according to DaRocha et al. [30]. In order to generate *TcMSH2* knockouts, fragments containing 5′and 3′ sequences of different alleles were also generated by gene SOEing [31]. *TcMSH2* upstream and downstream regions (approximately 500 pb each) were PCR-amplified and fused flanking a PCR-generated cassette containing the *HYG* gene. Transfection of epimastigotes was performed by electroporation with 50 μg DNA as described previously [30]. Twenty-four hours after transfection, 250 μg/mL of Hygromycin B or G418 was added to the cultures and selected population was obtained approximately 30 days after transfection. Clones were obtained by limiting dilution or by plating on semi-solid agar plates, after 30 days of incubation at 28 °C.

2.8. Recombinant protein expression

The sub-fragment encoding the N-terminal region (amino acids 1–442) of the TcMSH2 protein was obtained from digestion of the plasmid TOPO2.1 containing the *TcMSH2* gene and cloned directionally into the pET21a+ vector (Novagen), to generate a truncated His-tagged recombinant protein TcMSH2(t). The partially purified recombinant protein obtained from isopropylthiogalactoside induced bacterial cultures was electrophoresed on a 10% SDS-polyacrylamide gel. The 48 kDa corresponding band was excised and used to raise polyclonal antibodies in BALB/c mice by subcutaneous inoculation with Freund's adjuvant. Animals were boosted twice at 2 weeks intervals and bled after 6 weeks.

We used a MBP (maltose binding protein) gene fusion system to sub-clone and express a full-length *TcMSH2B* gene, PCR-amplified from genomic DNA using the following primers flanked by EcoRI and XbaI restriction sites, respectively. The amplicon was inserted into TOPO pCR4, which was digested with EcoRI and XbaI and the fragment was inserted into pMal-c2G (New England Biolabs). The recombinant protein obtained from isopropylthiogalactoside-induced bacterial cultures at 28 °C was purified by affinity chromatography on amylose columns.

2.9. ATPase assays

ATPase assays were carried out as described [32], using 2 pmol of purified MSH2::MBP or MBP alone (total volume 20 μL). Aliquots (2 μL) were removed at different time intervals (0 and 2 h) and the reactions were terminated by the addition of an equal volume of formamide. Samples were kept on ice before separation on a 20% polyacrylamide gel. Gels were exposed to a photographic film for 1 h at room temperature and the bands corresponding to ATP were quantified using a Phosphoimager Typhoon 8600 (Amersham). To test the effect of cadmium chloride on the ATPase activity, the reagent was added to a final concentration of 10 μM.

2.10. Statistical analyses

The results shown in this work were from triplicate determinations and represent three independent experiments performed by identical methods. The unpaired *t* test was used to determine the statistical significance (*p* value) of differences at each pair of groups. All analyses were performed using a *p* value of 0.05 with independent samples with unknown and different variances. For multiple comparisons, the one-way analysis of variance (ANOVA) was used, followed by Tukey's test.

3. Results

3.1. T. cruzi strains display differences in the susceptibility to alkylating agents and hydrogen peroxide

Cisplatin, a drug widely used in the treatment of cancer, forms intra and inter-strand Platinum-DNA cross-links, which kill the cell if inadequately repaired. *N*-methyl-*N*′-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) is an alkylating agent that induces methylation in the O^6 position of guanine [13]. MMR-proficient cells are more susceptible to both drugs since MMR proteins may act as DNA damage signal transducers to downstream effectors, participating in the initiation of cell death [33]. We investigated the effect of cisplatin and MNNG on different *T. cruzi* strains by incubation with increasing drug concentrations and determining cell viability after 5 days. The two strains that belong to the *T. cruzi* I group, Silvio X-10 cl1

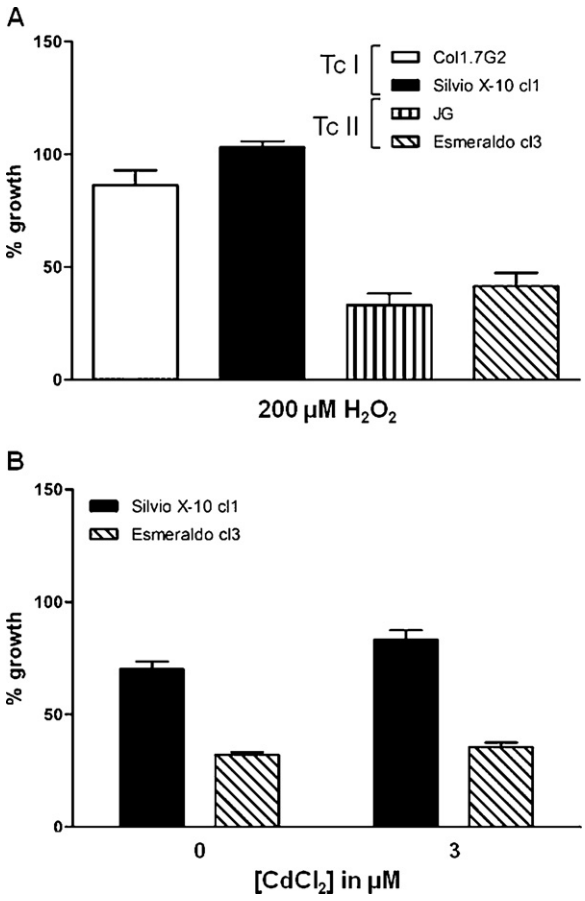


Fig. 1. Effect of H_2O_2-induced oxidative stress on the growth of *Trypanosoma cruzi* strains in the presence or absence of cadmium. Exponential cultures of epimastigotes were grown in LIT media containing (A) 200 μM H_2O_2 or (B) 200 μM H_2O_2 in the presence or absence of 3 μM Cd^{2+} for 5 days (B). Viable cells were determined with erythrosine B. Results are shown as mean ± SD of three independent experiments performed in triplicate.

and Col1.7G2, were more sensitive to treatment with both drug when compared to Esmeraldo cl3 and JG strains (which are *T. cruzi* II strains). The results shown in Supplementary Fig. 1A and C extend our previous observations [18] to a wider range of strains, confirming that there is a clear distinction between strains from *T. cruzi* I and II groups regarding the response to both DNA damaging agents. At cisplatin concentrations of 20 and 30 μM and MNNG concentrations of 25 and 50 μM, the differences between *T. cruzi* I and *T. cruzi* II strains are statistically significant ($p \leq 0.05$). The mechanisms underlying the difference in the sensitivity to these drugs involve MMR, since, when we repeated the treatment in the presence of cadmium, a potent inhibitor of ATP binding and hydrolysis activities of MSH2-MSH6 complex [34], the differences previously observed between the strains were abolished (Supplementary Fig. 1B and D).

Oxidative DNA damage, which can arise from endogenous metabolism, represents a particularly significant threat for an intracellular parasite. To further compare the response of *T. cruzi* I and II parasites to genotoxic agents, we investigated the ability of different *T. cruzi* strains to proliferate in the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2). Base lesions arising from oxidative DNA damage, such as 8-oxoG, if not removed by base-excision repair (BER), are recognized by MMR [14]. To test the response of *T. cruzi* strains to oxidative damage, 200 μM of H_2O_2 was added to epimastigote cultures and cell viability was determined after 5 days. As shown in Fig. 1A, the two groups of strains exhibited distinct responses to H_2O_2 ($p \leq 0.05$). In contrast to the results observed with cisplatin and MNNG treatments, *T. cruzi* I strains (Col1.7G2 and Silvio X-10 cl1) were more resistant to hydrogen peroxide treatment than *T. cruzi* II strains (JG and Esmeraldo cl3). These differences cannot be attributed to differences in the redox potential of the strains analyzed, as indicated by the results of comparative analysis of the oxidative metabolism of the strains using the MTT reduction assay (Supplementary Fig. 2A) and measuring NADPH production (Supplementary Fig. 2B). Also, in contrast to the response to cisplatin and MNNG treatments, cadmium did not abolish the differential responses of the *T. cruzi* strains to H_2O_2. As shown in Fig. 1B, when parasites were incubated with hydrogen peroxide in the presence of this MMR inhibitor, survival rates of the Silvio X-10 (*T. cruzi* I strain) remain higher than the Esmeraldo strain (*T. cruzi* II) ($p \leq 0.05$).

To assess more directly the effect of H_2O_2, we examined the accumulation of 8-oxoG in the genome of different *T. cruzi* strains before and after H_2O_2 treatment using avidin-conjugated FITC. Avidin is shown to bind with high specificity to 8-oxoG and has been used to detect oxidative DNA damage in different cell types [28]. As shown in Fig. 2A, strains belonging to *T. cruzi* I lineage (Col1.7G2 and Silvio X-10 cl1) present lower levels of the oxidized base than *T. cruzi* II strains (JG and Esmeraldo cl3). This difference ($p \leq 0.05$) is due to an increased accumulation of 8-oxoG in the kDNA of *T. cruzi* II strains after 20 min in the presence of 200 μM H_2O_2 (Fig. 2B). An increased accumulation of 8-oxoG in the DNA of a *T. cruzi* II strain (*T. cruzi* II) compared to a *T. cruzi* I (Silvio X-10) was also observed in experiments using HPLC/electrochemical detection analysis. Because of its high sensitivity and low saturation values, this method detected a much higher difference (145-fold) in 8-oxoG levels (Supplementary Fig. 3).

To verify whether the differences in the response to DNA damaging drugs could be due to differences in the expression of MSH2 among strains, we performed northern and Western blot analyses. As shown in Supplementary Fig. 4, no obvious differences the expression of *TcMSH2* mRNA or protein in all strains analyzed were found.

3.2. TcMSH2 from T. cruzi I strains displays higher ATPase activity

To directly investigate the role of TcMSH2 in the differential response of parasite strains to genotoxic treatments, we performed sequence analyses as well as *in vitro* assays with two recombinant isoforms of this protein. Whereas Col1.7G2 is a homozygous *T. cruzi* I strain, presenting two identical *TcMSH2*A alleles, CL Brener is a hybrid cloned strain and presents two *TcMSH2* alleles corresponding to MSH2-haplogroups B or C [18]. The alignment of the complete amino acid sequences of TcMSH2 B and C derived from CL Brener, and the TcMSH2 A from Col1.7G2, identified all common domains and motifs present in MSH2 from other organisms, as described for the *Thermus aquaticus* MutS [16]. A total of 29 amino acid substitutions, concentrated in domains I and II (mismatch recognition domain and connector domain) and domain V (which contains the Walker ATPase motif and the helix-turn-helix motif involved in the protein dimerization), was identified among the three MSH2 haplogroups, 6 of them corresponding to non-conservative substitutions (Supplementary Fig. 5).

MSH2 are ATPases and, while ATP binding seems not be required for initial recognition of mismatched substrate, ATP hydrolysis is involved in the subsequent steps of MMR [35,36]. Using *in vitro* assays, we compared ATP hydrolysis activities of recombinant TcMSH2 derived from *T. cruzi* I and II strains. As shown in Fig. 3A and C, recombinant TcMSH2 A, the isoform present in *T. cruzi* I strains shows higher levels of ATP hydrolysis after 2 h incubation when compared with the TcMSH2 B isoform, present in *T. cruzi* II strains. In Fig. 3B, it is also shown that cadmium has an inhibitory effect on the *in vitro* TcMSH2 ATPase activity.

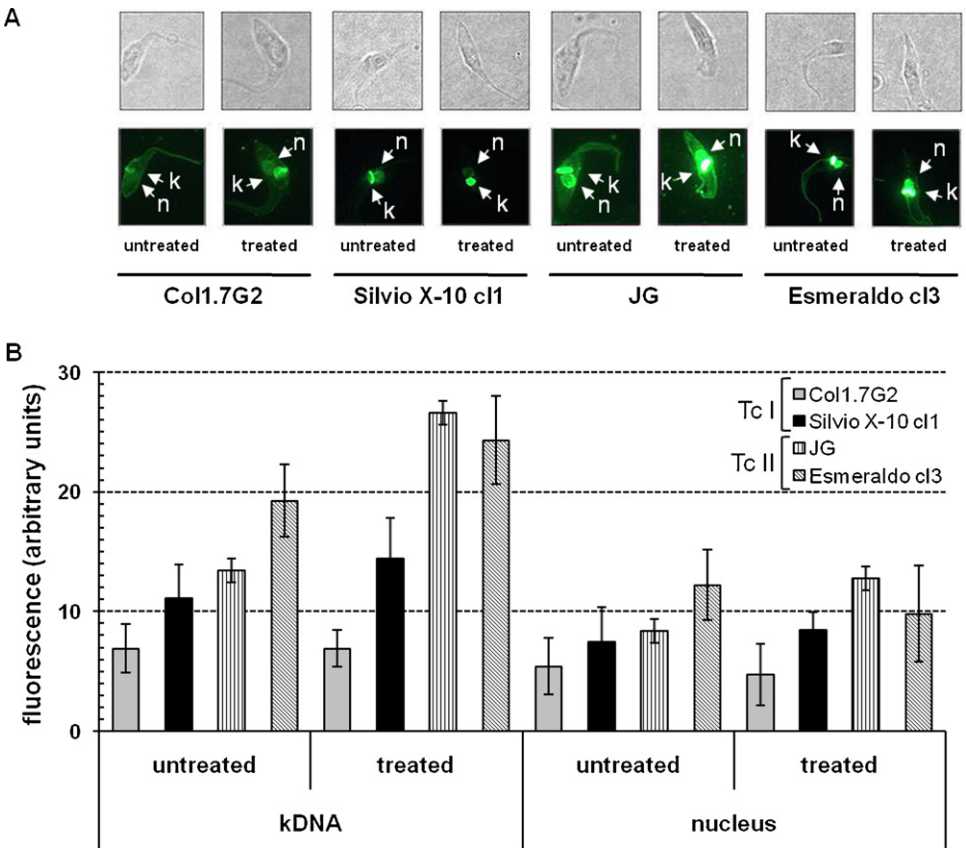
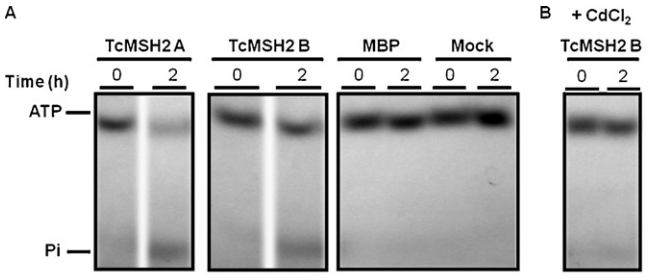


Fig. 2. Accumulation of 8-oxoguanine in different *T. cruzi* strains. Exponential cultures of epimastigotes (early log phase) were treated with 200 μM H_2O_2 for 20 min and fixed with 4% paraformaldehyde. After transferred to chamber glass slides they were incubated with 5 μg/mL avidin-FITC for 1 h. Slides were visualized in a bright field or by fluorescence (A) in a 100× oil immersion and fluorescence intensity was averaged with the ImageJ program (http://rsbweb.nih.gov/ij/) and plotted as fluorescence arbitrary units, as shown in B. The positions of nucleus (n) and the kinetoplast (k) are shown. Each bar represents the mean ± SD of 100 cells analyzed.

3.3. *TcMSH2 single knockout clones are more sensitive to oxidative stress*

To examine genetically the involvement of the MMR pathway in the differential response of *T. cruzi* to DNA damage, we attempted to generate null mutants for the *TcMSH2* gene. Using plasmid constructs aimed at homologous recombination with the *TcMSH2* gene, single allele deletions of *TcMSH2* (*ΔTcmsh2::HYG/TcMSH2* parasites) could readily be achieved in different parasite strains. However after several attempts, including transfections with constructs that are specific for both CL Brener alleles, we were not able to generate *TcMSH2* null mutants. As shown in Supplementary Fig. 6A, DNA amplifications with primers specific for *TcMSH2* alleles B and C, which are present in the CL Brener genome (see Supplementary Fig. 6B) and DNA isolated from two transfected cloned cell lines showed that the resistance gene was integrated at the *TcMSH2-B* allele. Disruption of the *TcMSH2-B* allele was also confirmed by Southern blot (Supplementary Fig. 6C and D) and by the analysis of *TcMSH2* transcript levels, which were reduced to about 50% after the single-allele deletion (Supplementary Fig. 6E). Analysis of more than 10 distinct *ΔTcmsh2::HYG* clones showed that, in every case, deletion of the *TcMSH2-B* allele had occurred (data not shown).

To investigate the phenotype of *TcMSH2* mutants, epimastigote culture of wild type and *ΔTcmsh2::HYG/TcMSH2* clones were compared. No significant difference of the growth curves of wild type and mutant cells were observed (data not shown). We also compared the growth of wild type and *ΔTcmsh2::HYG/TcMSH2* clones in the presence of increasing concentrations of cisplatin and found no differences (Fig. 4A). In contrast, when treated with 200 or 300 μM H_2O_2, all three cloned *ΔTcmsh2::HYG/TcMSH2* mutants presented a significantly lower tolerance ($p \leq 0.05$) than wild type cells (Fig. 4B). The effect of H_2O_2-induced oxidative damage was also observed by measuring the levels of 8-oxoG in the genome of wild type and *ΔTcmsh2::HYG/TcMSH2* cells (Fig. 4C). Although we observed no



	Uncleaved ATP (%)		
	0h	2h	2h + $CdCl_2$
TcMSH2 A (Col1.7G2)	100	42.6 ± 5.46	N.D.
TcMSH2 B (CL Brener)	100	71.1 ± 5.0	101.7 ± 5.24

Fig. 3. ATPase activity of MSH2 isoforms A (from Col1.7G2) and B (from CL Brener). Affinity purified TcMSH2::MBP proteins were incubated with [γ-^{32}P]ATP for 2 h at 37 °C. Negative controls were carried out in the absence of protein or in the presence of MBP only. The position of ATP and inorganic phosphate (Pi) are indicated (A). The effect of cadmium chloride ($CdCl_2$) on the ATPase activity of TcMSH2B was evaluated by adding 10 μM $CdCl_2$ to the reaction buffer prior to the assay (B) Radioactive bands corresponding to ATP were quantified using the Storm Phosphoimager (GE-HealthCare). ND: not determined (C).

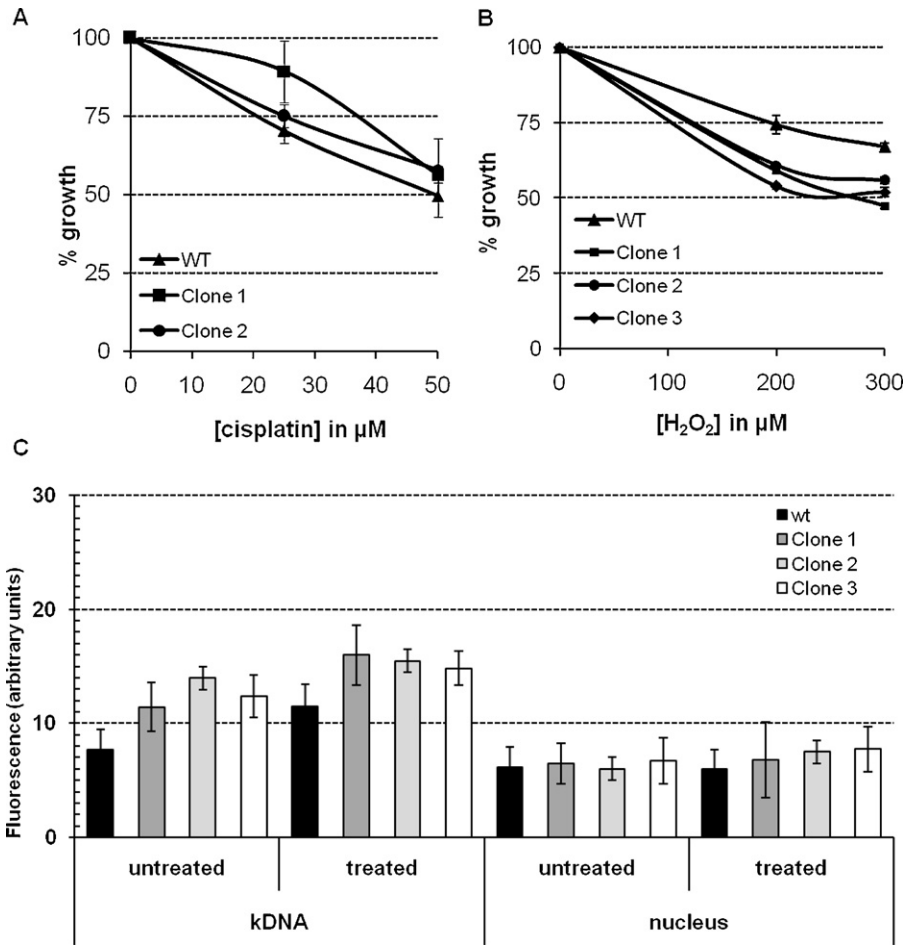


Fig. 4. Survival of *ΔTcmsh2::HYG/TcMSH2* clones in the presence of cisplatin and H_2O_2 and accumulation of 8-oxoguanine after oxidative stress damage. Wild type and *ΔTcmsh2::HYG/TcMSH2* clones were treated in early log phase with 25 and 50 μM cisplatin (A) or 200 and 300 μM H_2O_2 (B). After 5 days, viable cell numbers were determined using erythrosine B dye exclusion. Accumulation of 8-oxoG in the nucleus and kinetoplast DNA in wild type and *ΔTcmsh2::HYG/TcMSH2* mutants was measured before and after treatment with 300 μM H_2O_2 (C). Each bar represents the mean ± SD of 100 cells analyzed. Statistical differences ($p \leq 0.05$) were observed between clone 2 and wt cells in the analysis of kDNA both in untreated and treated parasites.

significant differences in the levels of 8-oxoG present in the nuclei of wild type and mutant strains before or after treatment with H_2O_2, increased amounts of the oxidized base were observed in the kDNA of *ΔTcmsh2::HYG/TcMSH2* mutant cell lines compared to wild type parasites ($p \leq 0.05$).

3.4. *Trypanosoma brucei MSH2 mutants display loss of mitochondrial DNA due to oxidative damage*

In contrast to *T. cruzi*, *MSH2* null mutants have been generated in *T. brucei* and are viable, at least in the bloodstream (mammalian-infective) stage of this parasite [21]. Similar to *T. cruzi ΔTcmsh2::HYG/TcMSH2* clones, *T. brucei MSH2* null mutants (*ΔTbmsh2::BSD/Tbmsh2::PUR*) are more sensitive to H_2O_2 than wild type [21]. To ask if this phenotype is also a manifestation of mitochondrial DNA damage, *TbMSH2* null mutants and wild type parasites were grown in increasing concentrations of H_2O_2 for 72 h and the DNA content of the cells analyzed microscopically after staining with DAPI. Kinetoplast (K) and nuclear (N) DNA synthesis and segregation occur at distinct times during the *T. brucei* cell cycle [37], meaning that parasites with 1N1K, 1N2K and 2N2K contents are found, normally representing the majority (~98%) of cell types in wild type cultures; the small minority of cells with differing N–K ratios ('others') arise due to errors in DNA replication, segregation or mitosis. Here, we found that, even before H_2O_2 treatment, *Tbmsh2* mutants displayed an elevation in the proportion of aberrant cells. Whereas the very small numbers of these aberrant cells in the wild type were essentially equally distributed between 0N1K and 2N1K types (Fig. 5A), virtually all were characterized by a loss of kDNA (predominantly having a 1N0K configuration) in the *Tbmsh2* null mutants (Fig. 5A–C). Treatment of *Tbmsh2* mutants with H_2O_2 accentuated this loss of kDNA to an extent that was substantially more pronounced ($p \leq 0.05$) than in wild type cells (Fig. 5A). These data suggest that in *T. brucei*, MSH2 deficiency, before and after H_2O_2-induced damage, results in accelerated loss of mitochondrial DNA, consistent with a function for MSH2 in mitochondrial genome repair or protection.

4. Discussion

MMR corrects mismatches generated during DNA replication. It also contributes to the control of endogenous levels of oxidized DNA bases present in the genome such as 8-oxoG [14]. In the *T. cruzi* population, MSH2, a central component of MMR, is encoded by three distinct alleles which can be correlated with the three major *T. cruzi* lineages [17,18]. Because distinct levels of genetic variability have been described among parasite strains belonging to each MSH2 haplogroup, we investigated the activity of this MMR protein and its involvement in the response of different parasite strains to various DNA damaging agents. In so doing, we reveal two things.

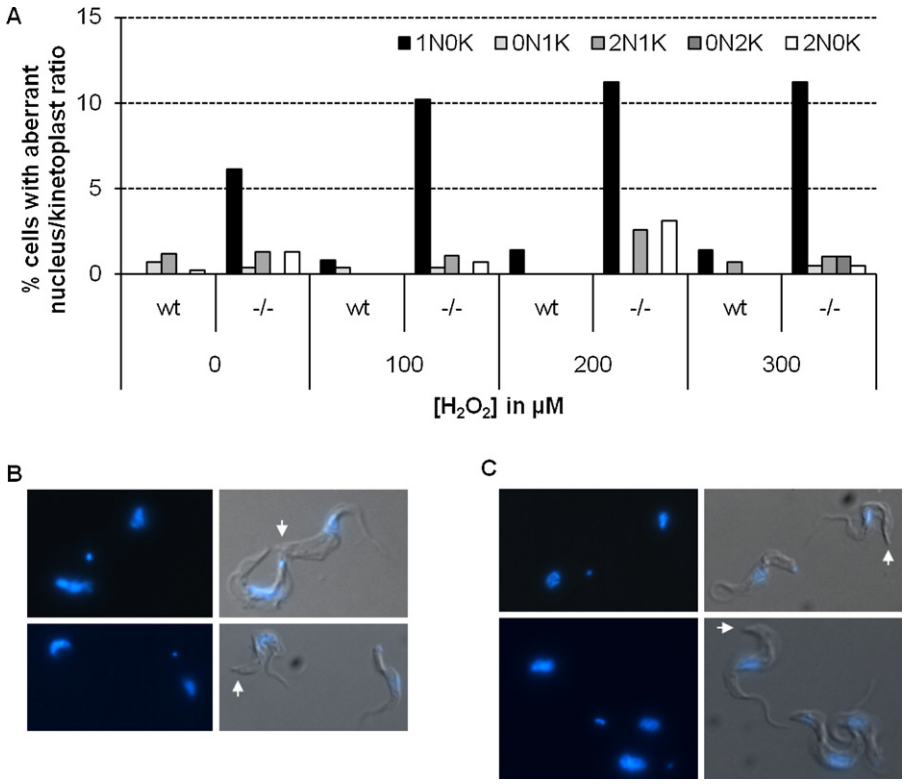


Fig. 5. Effect of MSH2 deletion on the DNA content of *T. brucei* before and after hydrogen peroxide exposure. (A) Quantitation of the nuclear (N) and kinetoplast (K) DNA content of *T. brucei* wild type and *ΔTcmsh2::BSD/Tcmsh2::PUR* mutants after 72 h growth in the presence or absence of increasing concentrations of H_2O_2. DNA in the cells was visualized by DAPI staining; >500 cells were counted in each sample. Only aberrant cells that differ from the expected N/K ratios (1N1K, 1N2K or 2N2K) are shown, as a percentage of the total population. (B, C) Examples of *ΔTcmsh2::BSD/Tcmsh2::PUR* cells lacking detectable kDNA are shown after 72 h growth in 100 μM H_2O_2 (B) or without H_2O_2 treatment (C); in all cases the cells are shown both as a DAPI-stain image or as a merge of DAPI and differential interference contrast images and arrows denote the cells lacking kDNA, which are shown beside 1N1K cells for comparison.

First, the level of MMR activity is distinct between *T. cruzi* lineage I and II strains. Second, we obtained evidences indicating that MSH2 in both *T. cruzi* and *T. brucei* provides a hitherto unseen function in protecting mitochondrial DNA from oxidative damage.

The involvement of MMR in generating genetic diversity and drug resistance has been described in several organisms, including pathogenic bacteria and other protozoan parasites. Analyses of hypermutable bacteria of different species isolated from human clinical isolates have shown that *mutS* inactivation is implicated in the mutator phenotype [38]. In *Toxoplasma gondii*, disruption of mitochondrial *MSH1* was found in parasites selected for monensin-resistance, a drug proven to be effective against apicomplexan parasites. As expected, the *MSH1* mutants were also resistant to the alkylating agent methylnitrosourea [39]. *Plasmodium* species are the only eukaryotes that encode two *MSH2* homologs. Disruption of one the *MSH2* loci in *Plasmodium falciparum* resulted in a slightly higher frequency of parasites resistant to 5-Fluoroorotate when mosquito-passaged mutants and wild type parasites were compared, suggesting that the function of the two *PfMSH2* genes may overlap [40]. Here we show that *T. cruzi* I and II strains respond differently when treated with genotoxic agents, such as cisplatin and MNNG. Because this difference was abolished when MMR activity was inhibited by cadmium, we suggest that the differential response among strains to these DNA damaging agents is due to differential activity of one of more components of the MMR. In agreement with previous studies with MMR mutants in different eukaryotic cells [13], the observed increased tolerance to cisplatin and MNNG in *T. cruzi* II parasites can be inferred to result from less efficient MMR. This is also consistent with previous results showing that *T. cruzi* II strains have increased nuclear genetic variability when compared with strains belonging to *T. cruzi* I lineage, an observation that may have major epidemiological significance [6]. The differences observed between strains in the response to genotoxic agents cannot be associated with different levels of expression of *TcMSH2*, since, in all strains analyzed, the levels of *TcMSH2* mRNA and protein were found to be similar. However, because *T. cruzi* I and *T. cruzi* II strains present distinct TcMSH2 isoforms, we proposed that sequence polymorphisms in TcMSH2 may be at least partially responsible for the differences in the response to these DNA damaging agents, an assumption that was corroborated by the results showing differences in ATPase activities from recombinant proteins MSH2A and MSH2B. Notwithstanding, variations in the efficiency of other components of MMR, as well as from other DNA repair pathways are also likely to be involved in modulating mutation rates in the *T. cruzi* population. Attempts to determine whether differences in mutation rates can be observed among distinct strains are underway.

To further investigate the role of TcMSH2 protein, we attempted to generate null mutants for the *TcMSH2* gene. Unexpectedly, we were unable to delete both alleles. This inability to generate *MSH2* null mutants is in sharp contrast with most other eukaryotes, including *T. brucei* bloodstream forms. Bloodstream forms of *TbMSH2* null mutants are viable, present an increased rate of sequence variation of nuclear microsatellite *loci* and increased tolerance to MNNG, as well as an increased frequency of homologous recombination [21,41]. The availability of *TbMSH2* null mutants allowed us to test whether the *TcMSH2* gene can complement MMR deficiency in *T. brucei* [22]. Although we were able to demonstrate heterologous expression of *T. cruzi* MSH2, MMR complementation, as assayed by resistance to MNNG and microsatellite instability, was not achieved. However, expression of *TcMSH2* in *TbMSH2* null

mutants resulted in reversion of the sensitivity to H_2O_2-induced oxidative stress. The observation described here that this mutation gives rise to a significant percentage of the dyskinetoplastic cells in *T. brucei*, even in the absence of induced oxidative stress, is striking. In contrast to *T. cruzi* epimastigote metabolism, which is largely dependent on oxidative phosphorylation and generates endogenous oxidative damage, *T. brucei* bloodstream forms rely exclusively on glycolysis for ATP production, which may explain why *TbMSH2* null mutants are viable.

Taken together, the results of the complementation assays in *T. brucei*, the non-viability of *TcMSH2* mutants, and the common phenotypes observed in the *TcMSH2* single knockout and *TbMSH2* null mutants suggest that MSH2 provides a function related to mitochondrial genome integrity in addition to its role in nuclear MMR. Such additional functions may be independent of at least some other components of MMR, since *TbMLH1* null mutants do not present increased sensitivity to H_2O_2 [22]. This finding is consistent with the observation here that incubation of *T. cruzi* cells with cadmium abolished the differences observed between strains in response to treatment with cisplatin and MNNG, but not with H_2O_2:cadmium is known to suppress the ATPase activity of MSH2/MSH6 complexes [33], which is likely to impair interaction with MLH1-containing heterodimers [36]. In both *Trypanosoma* species MSH2 abundance in *MSH2* mutants appears sufficient for nuclear MMR function. However, the *Tcmsh2* mutants showed higher sensitivity to H_2O_2-induced oxidative stress than wild type cells and increased accumulation of 8-oxoG, particularly in the kDNA. It can be speculated that the involvement of TcMSH2 in the response to oxidative stress is so relevant to mitochondrial function that a loss of a single allele would have a significant impact. The nature of such a mitochondrial role for MSH2 is unknown. Perhaps the protein compensates for the lack of MSH1, a mitochondrial DNA repair protein, for which an orthologous gene could not be identified in the *T. cruzi* genome [4]. A role of MSH2 in the control of oxidative DNA damage has been previously described in other cell types, such as mouse embryo fibroblasts in which increased levels of DNA 8-oxoG were detected after inactivation of the *MSH2* gene [42]. Additional functions of MSH2, MSH3, and PMS2 mismatch repair proteins have also been described, including homologous recombination, anti-recombination, DNA damage signaling, apoptosis, as well as site-specific mutagenesis during immunoglobulin somatic hypermutation and class switch recombination (reviewed in [43]). Nevertheless, these functions have been limited to nuclear activities, and the mitochondrial role we see here for MSH2 appears not to have been described thus far in any other organism.

Being an intracellular parasite, oxidative damage may have a significant effect on mutation rates in *T. cruzi*. In addition of MMR, other DNA repair pathways such as Base Excision Repair (BER) are certainly involved in the parasite response to oxidative damage in DNA. We and others have characterized two DNA polymerase beta from *T. cruzi* and showed that both enzymes co-localize with the parasite kinetoplast [44]. *T. cruzi* has a complex antioxidant defense system that includes enzymes like Fe-SOD (mitochondrial iron-containing superoxide dismutase), TcMPX and TcCPX (mitochondrial and cytoplasmic tryparedoxin peroxidases, respectively), and TcAPX (ascorbate-dependent haemoperoxidase), which are upregulated during transformation of the insect-derived non-infective epimastigotes into the infective metacyclic trypomastigote [45]. The evidences presented here indicating a novel role of MSH2 in *T. cruzi* and *T. brucei* in the complex mechanisms responsible for the oxidative stress response require further investigation, particularly regarding the study of MSH2 sub-cellular localization and interactions with other proteins. Whether this new role of MSH2 is part of the driving force behind the differential genetic variability observed within the *T. cruzi* population, it also remains to be investigated.

Acknowledgements

This work is supported by funds from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Brazil) and the Howard Hughes Medical Institute – HHMI. The work from MHGM was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Brazil), and the INCT de Processos Redox em Biomedicina – Redoxoma (Brazil). RMcC thanks the Medical Research Council and Wellcome Trust for funding. We thank Osmar F. Gomes for help with 8-oxoG analyses and Glynn Forsythe for help with microscopy.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.molbiopara.2010.11.001.

References

[1] Machado CR, Augusto-Pinto L, McCulloch R, Teixeira SM. DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. Mutat Res 2006;612:40–57.
[2] Momen H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94(Suppl 1):181–4.
[3] Zingales B, Andrade SG, Briones MR, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104:1051–4.
[4] El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. Science 2005;309:409–15.
[5] Machado CA, Ayala FJ. Sequence variation in the dihydrofolate reductase–thymidylate synthase (DHFR–TS) and trypanothione reductase (TR) genes of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 2002;121:33–47.
[6] Cerqueira GC, Bartholomeu DC, DaRocha WD, et al. Sequence diversity and evolution of multigene families in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 2008;157:65–72.
[7] Mathieu-Daude F, Bosseno MF, Garzon E, et al. Sequence diversity and differential expression of Tc52 immuno-regulatory protein in *Trypanosoma cruzi*: potential implications in the biological variability of strains. Parasitol Res 2007;101:1355–63.
[8] Trojan J, Zeuzem S, Randolph A, et al. Functional analysis of hMLH1 variants and HNPCC-related mutations using a human expression system. Gastroenterology 2002;122:211–9.
[9] Branch P, Aquilina G, Bignami M, Karran P. Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage. Nature 1993;362:652–4.
[10] Clark AB, Cook ME, Tran HT, Gordenin DA, Resnick MA, Kunkel TA. Functional analysis of human MutSalpha and MutSbeta complexes in yeast. Nucleic Acids Res 1999;27:736–42.
[11] Mena A, Smith EE, Burns JL, et al. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. J Bacteriol 2008;190:7910–7.
[12] Cejka P, Jiricny J. Interplay of DNA repair pathways controls methylation damage toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 2008;179:1835–44.
[13] Stojic L, Brun R, Jiricny J. Mismatch repair and DNA damage signalling. DNA Repair (Amst) 2004;3:1091–101.
[14] Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. Mutat Res 2003;531:231–51.
[15] Pogorzala LA, Mookerjee S, Sia EA. Evidence that Msh1p plays multiple roles in mitochondrial base excision repair. Genetics 2009.
[16] Augusto-Pinto L, Bartholomeu DC, Teixeira SM, Pena SD, Machado CR. Molecular cloning and characterization of the DNA mismatch repair gene class 2 from the *Trypanosoma cruzi*. Gene 2001;272:323–33.
[17] de Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathog 2006;2:e24.
[18] Augusto-Pinto L, Teixeira SM, Pena SD, Machado CR. Single-nucleotide polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. Genetics 2003;164:117–26.
[19] Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. Mol Biochem Parasitol 1999;100:163–72.
[20] Teixeira SM, Kirchhoff LV, Donelson JE. Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem 1995;270:22586–94.
[21] Bell JS, Harvey TI, Sims AM, McCulloch R. Characterization of components of the mismatch repair machinery in *Trypanosoma brucei*. Mol Microbiol 2004;51:159–73.
[22] Machado-Silva A, Teixeira SM, Franco GR, et al. Mismatch repair in *Trypanosoma brucei*: heterologous expression of MSH2 from *Trypanosoma cruzi* provides new insights into the response to oxidative damage. Gene 2008;411:19–26.

[23] Sonnhammer EL, Eddy SR, Durbin R. Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. Proteins 1997;28:405–20.
[24] Bairoch A. PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins. Nucleic Acids Res 1991;19(Suppl):2241–5.
[25] Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, et al. InterPro – an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. Bioinformatics 2000;16:1145–50.
[26] Finzi JK, Chiavegatto CW, Corat KF, et al. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. Mol Biochem Parasitol 2004;133:37–43.
[27] Mielniczki-Pereira AA, Chiavegatto CM, Lopez JA, Colli W, Alves MJ, Gadelha FR. *Trypanosoma cruzi* strains. Tulahuen 2 and Y, besides the difference in resistance to oxidative stress, display differential glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases activities. Acta Trop 2007;101:54–60.
[28] Struthers L, Patel R, Clark J, Thomas S. Direct detection of 8-oxodeoxyguanosine and 8-oxoguanine by avidin and its analogues. Anal Biochem 1998;255:20–31.
[29] Nakae D, Mizumoto Y, Kobayashi E, Noguchi O, Konishi Y. Improved genomic/nuclear DNA extraction for 8-hydroxydeoxyguanosine analysis of small amounts of rat liver tissue. Cancer Lett 1995;97:233–9.
[30] DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, et al. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. Parasitol Res 2004;92:113–20.
[31] Horton RM, Cai ZL, Ho SN, Pease LR. Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. Biotechniques 1990;8:528–35.
[32] Hughes MJ, Jiricny J. The purification of a human mismatch-binding protein and identification of its associated ATPase and helicase activities. J Biol Chem 1992;267:23876–82.
[33] Topping RP, Wilkinson JC, Scarpinato KD. Mismatch repair protein deficiency compromises cisplatin-induced apoptotic signaling. J Biol Chem 2009;284:14029–39.
[34] Jin YH, Clark AB, Slebos RJ, et al. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. Nat Genet 2003;34:326–9.
[35] Drotschmann K, Yang W, Kunkel TA. Evidence for sequential action of two ATPase active sites in yeast Msh2–Msh6. DNA Repair (Amst) 2002;1:743–53.
[36] Lin DP, Wang Y, Scherer SJ, et al. An Msh2 point mutation uncouples DNA mismatch repair and apoptosis. Cancer Res 2004;64:517–22.
[37] Hammarton TC, Monnerat S, Mottram JC. Cytokinesis in trypanosomatids. Curr Opin Microbiol 2007;10:520–7.
[38] Hall LM, Henderson-Begg SK. Hypermutable bacteria isolated from humans – a critical analysis. Microbiology 2006;152:2505–14.
[39] Garrison EM, Arrizabalaga G. Disruption of a mitochondrial MutS DNA repair enzyme homologue confers drug resistance in the parasite *Toxoplasma gondii*. Mol Microbiol 2009;72:425–41.
[40] Bethke L, Thomas S, Walker K, Lakhia R, Rangarajan R, Wirth D. The role of DNA mismatch repair in generating genetic diversity and drug resistance in malaria parasites. Mol Biochem Parasitol 2007;155:18–25.
[41] Bell JS, McCulloch R. Mismatch repair regulates homologous recombination, but has little influence on antigenic variation, in *Trypanosoma brucei*. J Biol Chem 2003;278:45182–8.
[42] Russo MT, De Luca G, Casorelli I, et al. Role of MUTYH and MSH2 in the control of oxidative DNA damage, genetic instability, and tumorigenesis. Cancer Res 2009;69:4372–9.
[43] Jun SH, Kim TG, Ban C. DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles. FEBS J 2006;273:1609–19.
[44] Lopes Dde O, Schamber-Reis BL, Regis-da-Silva CG, et al. Biochemical studies with DNA polymerase beta and DNA polymerase beta-PAK of *Trypanosoma cruzi* suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance. DNA Repair (Amst) 2008;7:1882–92.
[45] Piacenza L, Zago MP, Peluffo G, Alvarez MN, Basombrio MA, Radi R. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. Int J Parasitol 2009;39:1455–64.

Anexo 3

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS | NEGLECTED TROPICAL DISEASES

Genome of the Avirulent Human-Infective Trypanosome—*Trypanosoma rangeli*

Patrícia Hermes Stoco[1]*, Glauber Wagner[1,2], Carlos Talavera-Lopez[3], Alexandra Gerber[4], Arnaldo Zaha[5], Claudia Elizabeth Thompson[4], Daniella Castanheira Bartholomeu[6], Débora Denardin Lückemeyer[1], Diana Bahia[6,7], Elgion Loreto[8], Elisa Beatriz Prestes[1], Fábio Mitsuo Lima[7], Gabriela Rodrigues-Luiz[6], Gustavo Adolfo Vallejo[9], José Franco da Silveira Filho[7], Sérgio Schenkman[7], Karina Mariante Monteiro[5], Kevin Morris Tyler[10], Luiz Gonzaga Paula de Almeida[4], Mauro Freitas Ortiz[5], Miguel Angel Chiurillo[7,11], Milene Höehr de Moraes[1], Oberdan de Lima Cunha[4], Rondon Mendonça-Neto[6], Rosane Silva[12], Santuza Maria Ribeiro Teixeira[6], Silvane Maria Fonseca Murta[13], Thais Cristine Marques Sincero[1], Tiago Antonio de Oliveira Mendes[6], Turán Peter Urmenyi[12], Viviane Grazielle Silva[6], Wanderson Duarte DaRocha[14], Björn Andersson[3], Álvaro José Romanha[1], Mário Steindel[1], Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos[3], Edmundo Carlos Grisard[1]*

1 Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, **2** Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba, Santa Catarina, Brazil, **3** Department of Cell and Molecular Biology, Science for Life Laboratory, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, **4** Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil, **5** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **6** Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **7** Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, São Paulo, Brazil, **8** Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, **9** Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia, **10** Biomedical Research Centre, School of Medicine, Health Policy and Practice, University of East Anglia, Norwich, United Kingdom, **11** Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela, **12** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **13** Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **14** Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

Abstract

Background: *Trypanosoma rangeli* is a hemoflagellate protozoan parasite infecting humans and other wild and domestic mammals across Central and South America. It does not cause human disease, but it can be mistaken for the etiologic agent of Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*. We have sequenced the *T. rangeli* genome to provide new tools for elucidating the distinct and intriguing biology of this species and the key pathways related to interaction with its arthropod and mammalian hosts.

Methodology/Principal Findings: The *T. rangeli* haploid genome is ~24 Mb in length, and is the smallest and least repetitive trypanosomatid genome sequenced thus far. This parasite genome has shorter subtelomeric sequences compared to those of *T. cruzi* and *T. brucei*; displays intraspecific karyotype variability and lacks minichromosomes. Of the predicted 7,613 protein coding sequences, functional annotations could be determined for 2,415, while 5,043 are hypothetical proteins, some with evidence of protein expression. 7,101 genes (93%) are shared with other trypanosomatids that infect humans. An ortholog of the *dcl2* gene involved in the *T. brucei* RNAi pathway was found in *T. rangeli*, but the RNAi machinery is non-functional since the other genes in this pathway are pseudogenized. *T. rangeli* is highly susceptible to oxidative stress, a phenotype that may be explained by a smaller number of anti-oxidant defense enzymes and heat-shock proteins.

Conclusions/Significance: Phylogenetic comparison of nuclear and mitochondrial genes indicates that *T. rangeli* and *T. cruzi* are equidistant from *T. brucei*. In addition to revealing new aspects of trypanosome co-evolution within the vertebrate and invertebrate hosts, comparative genomic analysis with pathogenic trypanosomatids provides valuable new information that can be further explored with the aim of developing better diagnostic tools and/or therapeutic targets.

Citation: Stoco PH, Wagner G, Talavera-Lopez C, Gerber A, Zaha A, et al. (2014) Genome of the Avirulent Human-Infective Trypanosome—*Trypanosoma rangeli*. PLoS Negl Trop Dis 8(9): e3176. doi:10.1371/journal.pntd.0003176

Editor: Jessica C. Kissinger, University of Georgia, United States of America

Received December 21, 2013; **Accepted** August 8, 2014; **Published** September 18, 2014

Copyright: © 2014 Stoco et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from CNPq, CAPES, and FINEP (Brazilian Government Agencies). PHS, DB, GW, EBP, FML, MHdM, DDL, and TCMS were recipients of CNPq or CAPES Scholarships; MAC was a visiting professor at FAPESP. The funders had no role in the study design, data generation and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: patriciastoco@gmail.com (PHS); edmundo.grisard@ufsc.br (ECG)

Author Summary

Comparative genomics is a powerful tool that affords detailed study of the genetic and evolutionary basis for aspects of lifecycles and pathologies caused by phylogenetically related pathogens. The reference genome sequences of three trypanosomatids, *T. brucei*, *T. cruzi* and *L. major*, and subsequent addition of multiple *Leishmania* and *Trypanosoma* genomes has provided data upon which large-scale investigations delineating the complex systems biology of these human parasites has been built. Here, we compare the annotated genome sequence of *T. rangeli* strain SC-58 to available genomic sequence and annotation data from related species. We provide analysis of gene content, genome architecture and key characteristics associated with the biology of this non-pathogenic trypanosome. Moreover, we report striking new genomic features of *T. rangeli* compared with its closest relative, *T. cruzi*, such as (1) considerably less amplification on the gene copy number within multigene virulence factor families such as MASPs, trans-sialidases and mucins; (2) a reduced repertoire of genes encoding anti-oxidant defense enzymes; and (3) the presence of vestigial orthologs of the RNAi machinery, which are insufficient to constitute a functional pathway. Overall, the genome of *T. rangeli* provides for a much better understanding of the identity, evolution, regulation and function of trypanosome virulence determinants for both mammalian host and insect vector.

Introduction

Human trypanosomiases result in high morbidity and mortality, affecting millions of people in developing and underdeveloped countries. In Africa, Trypanosomiasis (sleeping sickness) is tsetse-transmitted and is caused by *Trypanosoma brucei gambiense* and *T. b. rhodesiense*; whereas, in the Americas, Trypanosomiasis (Chagas disease) is transmitted by triatomine bugs and is caused by *Trypanosoma cruzi*. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) is a third human infective trypanosome species that occurs in sympatry with *T. cruzi* in Central and South America, infecting a variety of mammalian species, including humans [1]. Natural mixed infections involving *T. rangeli* and *T. cruzi* have been reported in a wide geographical area for both mammals and the triatomine insect vectors [2,3].

Literature on serological cross-reactivity between *T. rangeli* and *T. cruzi* has documented an ongoing controversy, probably influenced by the parasite form and/or strain, the host infection time and the serological assay used. While several authors have reported serological cross-reactivity between *T. cruzi* and *T. rangeli* in assays of human sera by conventional immunodiagnostic tests [1,4–6], others have reported no cross-reactivity when recombinant antigens or species-specific synthetic peptides are used [7]. Recently, some species-specific proteins were identified in *T. rangeli* trypomastigotes which may provide for an effective differential in serodiagnosis [8].

In contrast to *T. brucei* and *T. cruzi*, *T. rangeli* is considered non-pathogenic to mammalian hosts but harmful to insect vectors, especially those from the genus *Rhodnius*. It causes morphological abnormalities and death of triatomine nymphs during molting [9,10]. *T. rangeli* is transmitted among mammals through an inoculative route during hematophagy [1–3]. The parasite life cycle in the triatomine is initiated by ingestion of trypomastigote forms during a blood meal on an infected mammal. After switching to its epimastigote form, the parasite multiplies and colonizes the insect gut, prior to invading the hemocoel through the intestinal epithelium. Once in the hemolymph, *T. rangeli* replicates freely and invades the salivary glands, wherein it differentiates into infective metacyclic trypomastigotes [1]. *T. rangeli* infection via the contaminative route (feces) may also occur, as observed for *T. cruzi*, given that infective trypomastigotes are also found in the vector gut and rectum.

Although *T. rangeli* has been found to infect more than 20 mammalian species from five different orders, the parasite's life cycle in these hosts is poorly understood. Between 48 to 72 hours after the inoculation of short metacyclic trypomastigotes (10 μm), a small number of large trypomastigotes (35–40 μm) are found in the bloodstream and appear to persist for 2–3 weeks, after which the infection becomes subpatent. Despite the lack of a visible parasites in the blood, the parasite has been isolated from experimentally infected mammals up to three years after infection [1]. However, neither extracellular nor intracellular multiplication of the parasite in the mammalian host has been clearly demonstrated thus far.

High intra-specific variability has been described between *T. rangeli* strains, using multiple molecular genetic markers [2,11–16]. A strong association of *T. rangeli* genetic groups with their local triatomine vector species has been demonstrated, and it has been proposed that the geographic distribution of the parasite' genotypes is associated with a particular evolutionary line of *Rhodnius* spp., indicating diversification may be tightly linked to host-parasite co-evolution [11,16–18].

The gene expression profiles of distinct forms and strains of *T. rangeli* representing the major phylogenetic lineages (KP1+ and KP1−) were assessed via sequencing of EST/ORESTES [19]. Despite the non-pathogenic nature of *T. rangeli* in mammals, comparison of these transcriptomic data with data from *T. cruzi* and other kinetoplastid species revealed the presence of several genes associated with virulence and pathogenicity in other pathogenic kinetoplastids, such as *gp63*, sialidases and oligopeptidases.

Although *T. rangeli* is not particularly pathogenic in mammals, in light of its resemblance, sympatric distribution and serological cross-reactivity with *T. cruzi*, we decided to sequence and analyze the genome of *T. rangeli*. Here, we present the *T. rangeli* genome sequence and a comparative analysis of the predicted protein repertoire to reveal unique biological aspects of this taxon. Our findings may be useful for understanding the virulence and emergence of the human infectivity of *Trypanosoma* species.

Methods

Parasites culture and DNA extraction

Epimastigotes from the *T. rangeli* SC-58 (KP1−) and Choachí (KP1+) strains were maintained in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 15% FCS at 27°C after cyclic mouse-triatomine-mouse passages. The *T. cruzi* CL Brener and Y strains were maintained in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 10% FCS at 27°C. All samples tested negative for the presence of *Mycoplasma* sp. by PCR. For DNA sequencing, exponential growth phase epimastigotes from *T. rangeli* SC-58 strain were washed twice in sterile PBS and genomic DNA was extracted from parasites using the phenol/chloroform method.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and hybridization

Chromosomal DNA was isolated and fractionated via PFGE as described elsewhere [20,21]. Briefly, 1.1% agarose gels were prepared in 0.5X TBE (45 mM Tris; 45 mM boric acid; 1 mM EDTA, pH 8.3), and agarose plugs containing the samples were

loaded into the gels and electrophoresed using the Gene Navigator System (Amersham Pharmacia Biotech) at 13°C for 132 hours. The gels were then stained with ethidium bromide (EtBr) (0.5 mg/mL). The chromosomal bands of *T. rangeli* (Choachí and SC-58 strains) and *T. cruzi* (CL Brener clone) were fractioned using a protocol optimized to separate small DNA molecules in the CHEF Mapper system to assess the presence of minichromosomes.

DNA library construction and sequencing

Library generation and sequencing were performed at the Computational Genomics Unit Darcy Fontoura de Almeida (UGCDFA) of the National Laboratory of Scientific Computation (LNCC) (Petrópolis, RJ, Brazil). 454 GS-FLX Titanium sequencing was utilized. Two sequencing libraries were prepared from *T. rangeli* SC-58 gDNA: one shotgun library (SG) and one 3 kb paired-end library (PE). Each library was constructed from 5 µg of genomic DNA (gDNA) following the GS FLX Titanium series protocols. All titrations, emulsions, PCR, and sequencing steps were carried out according to the manufacturer's protocol. One full PicoTiterPlate (PTP) was used to sequence each library.

Genome assembly and automated functional annotation

In order to estimate the *T. rangeli* genome size, a pipeline developed at the Karolinska Institutet (KI) generated a genome assembly. Briefly, the 454 SFF (Standard Flowgram Format) files were processed using custom Perl scripts to generate paired-end (PE) FASTQ files. Subsequently, the SFF files were assembled without prior treatment using the Newbler assembler. The resulting assembly was scaffolded using SSPACE 2.1.0 with the generated 454 PE reads, and finally, assembly gaps were improved using GapFiller 1.11.

In order to specifically identify conserved protein coding regions, an alternate, protein-centric procedure was also utilized. A reference-guided assembly of *T. rangeli* genic regions was carried out using protein sequences from TriTrypDB as formerly described [22], resulting in an overview of the predicted parasite proteome. For this, 73,808 protein sequences were selected from the TriTrypDB (release 3.3 – http://tritrypdb.org/common/downloads/) and used for comparative analysis. All proteins retrieved from TriTrypDB were clustered by BBH (Bidirectional Best Hit), totaling 8,807 clusters. Parasite proteins that were not clustered were also used, for a total of 16,347 protein sequences. Sequences containing start codons different from ATG or containing stop codons in the middle of the sequence were filtered out. For each cluster, one protein was selected based on the following hierarchical criteria: (1) a *T. cruzi* protein with annotated function, or (2) a protein with annotated function from an organism different than *T. cruzi*, or (3) a *T. cruzi* hypothetical protein, or (4) the largest protein. The selected sequences were compared to reads from *T. rangeli* using *tBLASTn*, applying an E-value cut-off threshold of 1e–5 to define a set of significant reads to reconstruct each protein sequence. Each protein sequence was reconstructed with the counterpart set of reads selected using the software Newbler 2.5.3 according to the default parameters.

Automatic functional annotation of the *T. rangeli* genome was performed using the System for Automated Bacterial Integrated Annotation (SABIA) [23], including the previously generated and annotated EST/ORESTES database [19] and proteomic data obtained from surface of *T. rangeli* trypomastigotes [8].

The assembled nucleotide sequences were translated to aminoacid sequence and annotated according to the following criteria:

- Proteins with *BLASTp* hits in the KEGG database and with a minimum 60% coverage of both the query and the subject sequence: the first ten hits were analyzed, and the product was imported from KEGG ORTHOLOGY (KO) if one was associated with the hit, or from the KEGG GENES definition if no KO was associated with the first ten hits.
- Proteins with *BLASTp* hits in NCBI-nr, UniProtKB/Swiss-Prot or TCDB [24] databases and with a subject and query coverage ≥60% were assigned as annotated or hypothetical, depending on the annotation imported from the database.
- Proteins with no *BLASTp* hits in the databases mentioned above and no InterPro results or CDSs that did not fit the above criteria were designated hypothetical.
- Note – some proteins with hypothetical function have confirmed protein expression by MS/MS [8].

Mobile genetic elements

Transposable elements were screened in genome assembly (KI) based on similarity using *BLASTn*, *tBLASTn* and *tBLASTx* tools [25]. As queries, the Repbase sequences described for the Euglenozoa group were used [26]. The *BLAST* results were filtered using the following parameters (e-value≤0.01, identity ≥ 50%, score≥80), *tBLASTx* (e-value≤0.01, identity ≥30%, score≥ 100) and *tBLASTn* (e-value≤0.01, identity ≥30%, score≥100). The retrieved sequences (protein and nucleotide) were aligned with the reference sequences and were manually curated. For *ab initio* searches, the software RepeatScout, release 1.0.5 was used [27].

Gene copy number estimation

Peptides sequences from nine selected trypanosomatid multigene families (MASP, GP63, Trans-sialidase, Amastin, DGF, KMP-11, Tuzin, RHS and Mucin) were downloaded from TriTrypDB (tritrypdb.org). *T. rangeli* reads were then aligned against all members of each multigene family using *BLASTx* algorithm [25] and the reads from the best hits were selected. Those reads were assembled using CAP3 [28] and the resulting contigs were re-aligned against the NR (non-redundant) database from GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) and manually inspected to verify that they belong to the aforementioned multigene families. These validated contigs were used to construct a database corresponding to a subset of *T. rangeli* coding sequences belonging to the selected multigene families, except for the mucin genes. To determine gene copy number, the entire read dataset from the *T. rangeli* genome and all contigs generated, as described above, were aligned using reciprocal MegaBLAST and all reads corresponding to each contig were selected. After checking, the cut off for minimal identity (with no convergence in reads picking) was set as 95% identity, 10e-15 e-value and at least 80% of read coverage. The best hits were computed and used to calculate the read depth for each nucleotide and the regions covered with the highest rates were selected for the downstream analyses. The selected regions from each contig displaying high coverage values were realigned to NR protein database to verify specific multigene family before the copy numbers for each contig were calculated using the nucleotide by nucleotide coverages obtained with the z-score algorithm. The final coverage for each contig was then calculated after dividing the z-score value by the calculated genome sequencing coverage of 13.78. For all multigene families we added the values obtained as a copy number estimation for each contig to determine the final values displayed as the gene copy number of each family. For

mucin genes, because signal peptide sequences are highly conserved in the different members of this family, the read coverage was carried only for the first 75 nucleotide present in the AUPL00006796 gene. To validate our method for copy number estimations and also to verify that the cutoff values were accurate this pipeline was applied to three genes known to be present as single copy genes in most trypanosomatid genomes (*msh2, msh6* and *gpi8*).

Phylogenomic analyses of the Trypanosomatidae family

A phylogenomic analysis was carried out using all orthologous proteins from distinct species of the Trypanosomatidae family (*T. rangeli* SC-58, *T. cruzi* CL Brener Esmeraldo-like, *T. cruzi* CL Brener non-Esmeraldo-like, *T. cruzi* Sylvio X10, *T. brucei*, *L. braziliensis*, *L. infantum* and *L. major*). The multi-FASTA ortholog files containing the best representative of each trypanosomatidae protein sequence were used as inputs for multiple alignments with the default parameters of the CLUSTAL Omega algorithm [29]. All alignments were visually inspected and manually annotated whenever necessary the removal of low quality alignments. Subsequently, protein concatenation of the 1,557 alignment files obtained was carried out using SCaFos software [30].

Phylogenies from the concatenated deduced amino acid sequences of all species were estimated through both protein distance and probabilistic methods, using the PHYLIP package [31] and TREE-PUZZLE [32], respectively. The Seqboot program of the PHYLIP package was used to generate multiple 100-bootstrapped datasets, which were submitted to ProtDist software to compute a distance matrix under the JTT (Jones-Taylor-Thornton) model of amino acid replacement. The neighbor-joining (NJ) method [33] was applied to the resultant multiple datasets, implemented in Neighbor software, which constructed trees via successive clustering of lineages.

The quartet-puzzling [34] search algorithm implemented by TREE-PUZZLE was used to reconstruct phylogenetic trees based on maximum likelihood (ML). The Jones-Taylor-Thornton (JTT) model of amino acid substitution was applied. The quartet-puzzling tree topology was based on 1,000 puzzling steps. The consensus tree was constructed considering a 50% majority rule consensus. The TreeView program [35] and MEGA 5 [36] were used to visualize and edit the resultant phylogenies.

Kinases

All protein kinase and phosphatidylinositol kinase sequences were selected and manually curated and re-annotated using the following software: Kinomer v. 1.0 web server [37], Kinbase (http://www.kinase.com/kinbase/), SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/), Interproscan (http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/) and Motifscan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan). The presence of accessory domains and the domain architecture of some proteins, such as those from the AGC group, were decisive in classifying them into a group. PIK and PIK-related kinases were classified according to previous reports [38–41].

Repetitive sequences

Analyses were performed using Tandem Repeat Finder (TRF) [42] and Tandem Repeat Assembly Program (TRAP) [43] software. The *T. rangeli* genome assembly (KI) and transcriptome [19] (2.45 Mb) sequences were submitted to TRF using the default parameters, except for minimum score of 25, as were 32.5 Mb of *T. cruzi* CL Brener Esmeraldo-like genome sequences from TriTrypDB using the same software parameters. The TRF output files were compiled using TRAP software, and we categorized the repeat sequences into four groups: microsatellites (1 to 6 nucleotides), unclassified (7 to 11 nucleotides), minisatellites (12 to 100 nucleotides) and satellite sequences (up to 100 nucleotides). The abundance, frequency and density of all *T. rangeli* repeat categories were calculated. Microsatellite classes were also analyzed considering all possible combinations; e.g., the repeat locus AGAT also included GATA, ATAG, TAGA and the reverses complements TCTA, CTAT, TATC and ATCT.

Functional characterization of the RNAi machinery

To identify RNAi-related genes in the *T. rangeli* genome assembly, a set of 39 primers targeting the five genes constituting the RNAi machinery were designed and used to amplify these genes from the parasite genome by PCR. The PCR products were then purified using the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare) and cloned into pGEM-T-Easy vectors (Promega) or directly sequenced. Both strands of the PCR products or inserts were sequenced in a MegaBase automated sequencer, as directed by the manufacturer (GE Healthcare). After quality assessment using the Phred/Phrap/Consed package, sequences showing a Phred>30 were used along with the genome sequences to assemble the RNAi genes. Alignment of the consensus *T. rangeli* sequences with the *T. brucei* RNAi genes (TriTrypDB accession numbers Tb927.10.10850, Tb927.8.2370, Tb927.3.1230, Tb10.6k15.1610 and Tb927.10.10730) was carried out using MultiAlin [44].

Functional characterization of the *T. rangeli* RNAi machinery was performed using parasites transfected with the pTEXeGFP plasmid, kindly donated by Dr. John Kelly (LSHTM, UK). Silencing of eGFP was conducted using the TriFECTa exogenous reporter gene EGFP-S1 DS Positive Control (IDT) or the eGFP antisense siRNA EGFP-AS (5′-UGC AGA UGA ACU UCA GGG UCA-3′). Vero cells transfected with the pEGFP e1 plasmid (Clontech) were used as a positive control. All transfections were carried out in biological triplicates using a Nucleofector II device and the Human T Cell Nucleofector kit (Lonza). eGFP expression and silencing was assessed in both parasites and cells by Western blotting, flow cytometry analysis (FACS), direct fluorescence (FA) and qPCR. In the Western blot assays, an anti-GFP antibody (Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:2,000 was employed, according to standard protocols, and flow cytometry was carried out in a FACSCanto II (BD) apparatus.

Additionally, the functionality of the *T. rangeli* RNAi machinery was assessed through the transfection of epimastigote forms with the TUBdsRNA-RFP plasmid [45]. The evaluation of cell morphology and detection of RFP fluorescence were carried out at 6, 12, 24, 48 and 72 hours post-transfection using a BX FL 40 microscope (Olympus).

Results and Discussion

General features of the *T. rangeli* genome

The karyotypes of representative strains from two major *T. rangeli* lineages [Choachí (KP1+) and SC-58 (KP1−)] were obtained via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Two chromosomal-band size classes were defined: 1) megabase bands (those ranging from 2.19 to 3.5 Mb) 2) smaller bands, (ranging from 0.40 and 1.48 Mb). This analysis revealed at least 16 chromosomal-bands, whose sizes varied from 0.40 to 3.44 Mb; two megabase bands and 13–14 smaller bands (Figure 1A). We used specific PFGE separation conditions to confirm the absence of mini-chromosomes (Figure 1B), which are present in *T. brucei*, [46], but not in *T. cruzi*. The fluorescence intensity varied between these

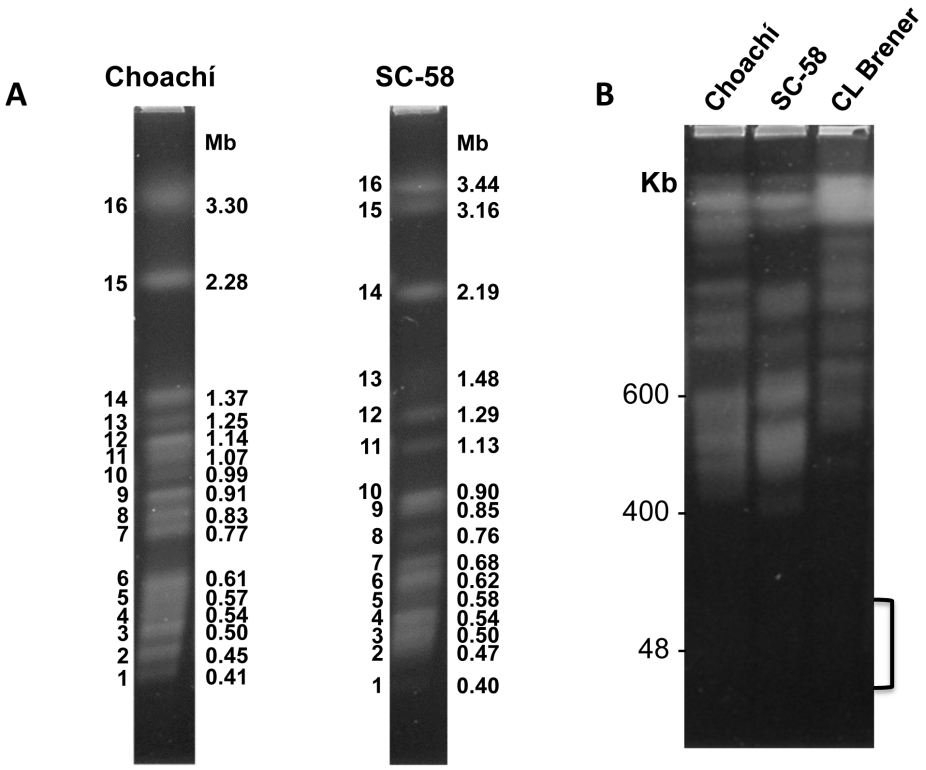


Figure 1. Molecular karyotype of *Trypanosoma rangeli*. **A**. Chromosomal bands of Choachí and SC-58 isolates were separated via PFGE and stained with ethidium bromide. The bands were numbered using Arabic numerals, starting from the smallest band. **B**. Chromosomal bands from *T. rangeli* (Choachí and SC-58 strains) and *T. cruzi* (clone CL Brener) were fractioned using a protocol optimized to separate small DNA molecules, revealing the absence of minichromosomes. The brackets represent the size range of *T. brucei* minichromosomes (30 and 150 kbp).
doi:10.1371/journal.pntd.0003176.g001

chromosomal bands, suggesting that co-migrating chromosomes are not necessarily homologous and that ploidy differences exist. The occurrence of aneuploidy has been demonstrated in different *T. cruzi* strains [21,47] and in various species and isolates of *Leishmania* spp. [48,49]. Of the 16 chromosomal bands identified, only seven were of a similar molecular size in the two *T. rangeli* isolates, confirming the existence of chromosomal size polymorphism, as demonstrated previously [50–52]. Therefore, analogously to *T. cruzi*, these 16 chromosomal bands may not reflect the actual number of chromosomes. Rather, this number is most likely higher than 16, as a single band may contain co-migrating heterologous chromosomes of similar sizes. Further studies will be needed to define the exact number of chromosomes and ploidy in *T. rangeli*.

Based on *ssu rDNA* and *gapdh* gene sequences, *T. rangeli* was phylogenetically positioned relatively closer to *T. cruzi* than to *T. brucei* [12]. This evolutionary proximity may also be reflected in the chromosomal organization of these species. It has been suggested that the common ancestor of trypanosomes exhibited smaller and more fragmented chromosomes and that fusion events occurred in the *T. brucei* lineage, leading to the smaller number of chromosomes currently observed [53]. Consistent with this idea, the chromosomal organization of *T. rangeli* also shows smaller and possibly more fragmented chromosomes, similar to those of *T. cruzi* [21].

The general characteristics of the *T. rangeli* genome sequence are shown in Table 1 (GenBank accession AUPL00000000). The applied 454-based approach allowed the generation of 2,206,288 reads, which after reference-guided assembly to representative kinetoplastid gene sequences available at TriTrypDB, resulted in identification of a total of 7,613 coding sequences (CDS) from the *T. rangeli* reads. These CDSs include tRNAs encoding all 20 amino acids. In addition, we identify 33 genes corresponding to the typical trypanosomatid rRNAs (5.8S, 18S and 28S) (GenBank accession KJ742907). As has been observed for numerous other pathogenic and non-pathogenic trypanosomatids [54], a high percentage of *T. rangeli* genes (~65.6%) encode hypothetical proteins. Among these genes, 44 show evidence of expression as revealed by *BLASTx* similarity to proteins detected via mass spectrometry on the surface of *T. rangeli* trypomastigotes [8]. Comparative sequence analysis revealed that 7,101 CDS (93%) of the identified *T. rangeli* genes are shared with other human pathogenic trypanosomes (Figure 2). *T. rangeli* shares 403 gene clusters exclusively with *T. cruzi*, thus reinforcing the phylogenetic relationship of these species. The conserved genome core of the 5,178 gene clusters present in all species (*T. rangeli*, *T. cruzi*, *T. brucei* and *L. major*) are mainly involved in fundamental biological processes and to host-parasite interactions (Figure 2), representing ~84% of the TriTryp (*T. cruzi*, *T. brucei* and *L. major*) genome core [55].

In addition to reference-based gene assembly, a relatively high-quality *de novo* genome assembly was generated from paired-end reads utilizing the Karolinska Institutet pipeline. The final genome assembly contains 259 scaffolds with 4.42% gaps. Given the NG50 (statistic of scaffold lengths) of (202,734 bp) and the low repeat content of this genome, it is clear that most of the genome has been reconstructed. The assembly obtained by using the pipeline corroborates our draft reference-guided assembly data, suggesting a size of the *T. rangeli* genome of ~24 Mb. Thus, the *T. rangeli* genome is the smallest and least repetitive trypanosomatid genome

Table 1. General characteristics of the *T. rangeli* genome.

Genome size (Mbp)	24
Coverage: Sequencing	13.78 X
G+C content (%): Genome	49.91
G+C content (%): CDS	54.27
Coding region (% of genome size)	37.77
Number of known protein CDSs*	2,415
Number of hypothetical CDSs	5,043
Number of partial/truncated CDSs	155
Average CDSs length (bp)	1,374
tRNA	55
Total number of CDSs	7,613

* Excluding proteins of unknown function.
doi:10.1371/journal.pntd.0003176.t001

obtained to date including *T. cruzi* CL Brener and Sylvio X-10, *T. cruzi marinkellei*, *T. brucei* and *Leishmania* sp. [56–61].

Phylogenomics of trypanosomatidae

Based on a total of 1,557 orthologous sequences representing different CDSs encoded by 8 different trypanosomatid genomes, an alignment of 964,591 concatenated amino acid residues was obtained and used to create NJ and ML tree topologies that were robust and revealed that South American trypanosomes (*T. rangeli* and *T. cruzi*) are equidistant from the African trypanosome (*T. brucei*) (Figures 3A and 3B). Despite the well-established genomic variability among *T. cruzi* strains, sequences derived from all strains CL Brener - Esmeraldo and non-Esmeraldo-like haplotypes - and Sylvio X10, clustered closer to *T. rangeli* than to *T. brucei* with high bootstrap values. The use of a phylogenomic approach to assess the evolutionary history of trypanosomatids clearly positioned *T. rangeli* closer to *T. cruzi* than *T. brucei* at the genomic level, corroborating former studies using single or a few genes [2,3,11,13,14,16,19]. *T. rangeli* and *T. cruzi* share conserved gene sequences with remarkably few genes or paralog groups that are unique to each one of the two species. Nevertheless, the divergence between *T. rangeli* and any *T. cruzi* strain is much greater than the differences among *T. cruzi* strains. As expected, all *Leishmania* species (*L. braziliensis*, *L. infantum*, and *L. major*) were clustered to a distinct branch.

Simple repeats

The abundance, frequency and density of non-coding tandem repeat sequences found in the *T. rangeli* genome and transcriptome sequences; as well as a comparison of satellite DNA sequences to the *T. cruzi* haploid genome; are presented in Table S1. Approximately 1.27 Mb (6%) of the current *T. rangeli* genome assembly (~24 Mb) is composed of tandem repeat sequences. Microsatellites are the most abundant repeats in both the *T. rangeli* (0.78 Mb, or 3.9%) and *T. cruzi* CL Brener (1.01 Mb, or 2.8%) genomes. We were able to identify 42,279 microsatellite loci, distributed in 400 non-redundant classes, in the *T. rangeli* genome sequence (Table S2). Approximately 4.7% (1,997) of these loci were found in the *T. rangeli* transcriptome [19] (Table S2). The microsatellite density and relative abundance in the *T. rangeli* genome assembly were estimated to be 38,678 bp/Mb and 3.87%, respectively. Interestingly, despite the relative abundance and the variation in the copy number of the 125 bp of satellite DNA observed in *T. cruzi* strains [62], these repeats were not found in the *T. rangeli* genome.

Mobile genetic elements

Transposable elements (TEs) represent a significant source of genetic diversity, and the fraction of particular genomes that correspond to TEs is highly variable [63]. Furthermore, TEs have been widely used as tools for genome manipulation as transgenic vectors or for gene tagging in organisms ranging from different microbes to mammals [64,65], including the protozoan parasites

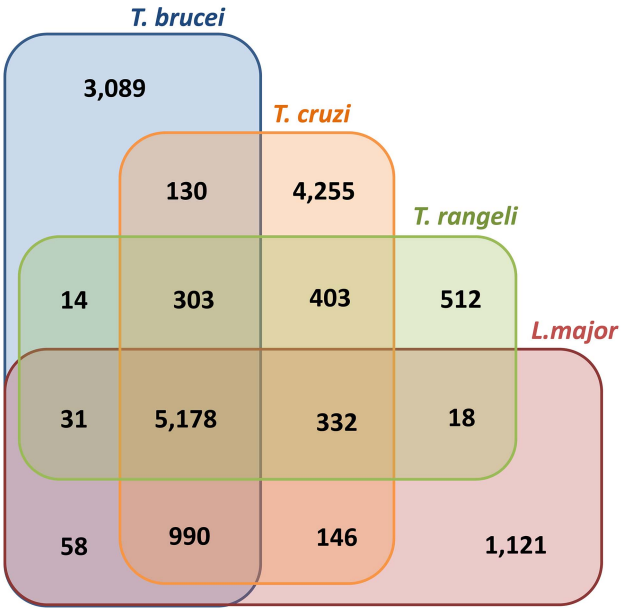


Figure 2. Number of gene clusters shared by the *T. rangeli*, *T. cruzi*, *T. brucei* and *L. major* genomes. Analyzes were performed using the following genome versions and gene numbers retrieved from the TriTrypDB: *Leishmania major* Friedlin (V. 7.0/8,400 genes), *Trypanosoma brucei* TREU927 (V. 5.0/10,574 genes), *Trypanosoma cruzi* CL Brener Esmeraldo (V. 7.0/10,342 genes) and Non-Esmeraldo (V. 7.0/10,834 genes). A total of 7,613 *T. rangeli* genes were used. BBH analysis used a cut-off value of 1e-05, positive similarity type and similarity value of 40% following manual trimming for comparison with COG analysis in [55] generating the numbers in the rectangles.
doi:10.1371/journal.pntd.0003176.g002

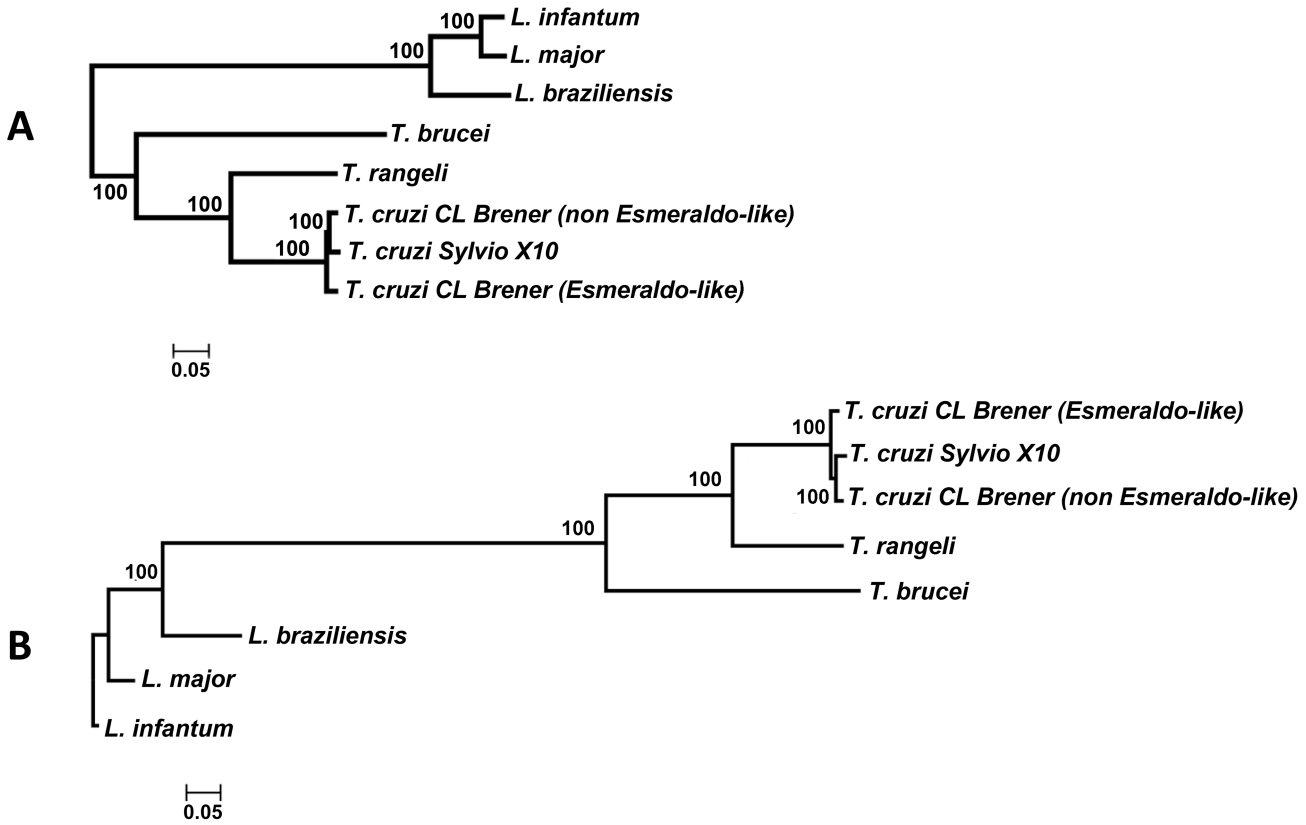


Figure 3. Evolutionary history of the Trypanosomatidae family obtained through a phylogenomic approach using (A) **the neighbor joining (NJ) or** (B) **the maximum likelihood (ML) methods.** In the NJ results, the percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (100 replicates) is shown next to the branches. In the ML results, each internal branch indicates, as a percentage, how often the corresponding cluster was found among the 1,000 intermediate trees. The scale bar represents the number of amino acid substitutions per site.
doi:10.1371/journal.pntd.0003176.g003

Leishmania sp., *Trypanosoma* sp. and *Plasmodium* sp. [66–68]. In the genomes of the kinetoplastid protozoa analyzed thus far, only retrotransposon elements have been found. Trypanosomes retain long autonomous non-LTR retrotransposons ~ *ingi (T. brucei)* and *L1Tc* (*T. cruzi*); site-specific retroposons *SLACS (T. brucei)* and *CZAR* (*T. cruzi*); and short nonautonomous truncated versions (RIME, NARTc), in addition to degenerate *ingi*-related retroposons with no coding capacity (DIREs) as also observed for *L. major* [60], *L. infantum* and *L. braziliensis* [61]. A long autonomous LTR retrotransposon, designated *VIPER*, has also been described in *T. cruzi* [56,57]. *L. braziliensis* contains *SLACS/CZAR*-related elements and the Telomeric Associated Transposable Elements (TATEs) [61].

Intact copies and putative autonomous TEs were not found in the *T. rangeli* genome. However, we identified 96 remnants of retrotransposons, which are most closely related to those of *T. cruzi*. The LTR retrotransposon *VIPER* was present as 39 copies, the non-LTR retroposons *ingi/RHS* as 51 copies; *L1TC*, five copies; and a single copy of *CZAR*. In contrast to *T. cruzi* and *T. brucei*, which maintain autonomous elements, and *L. braziliensis* with intact TATE elements at chromosome ends, *T. rangeli*, *L. major* and *L. infantum* harbors only degenerate elements, suggesting that TEs have been selectively lost during the course of recent evolution.

Multigene families encoding surface proteins

Typically, a significant proportion of a trypanosomatid genome contains large families that encode surface proteins. Many of these proteins function as host cell adhesion molecules involved in cell invasion, as components of immune evasion mechanisms or as signaling proteins. We selected nine gene families that encode surface proteins present in *T. cruzi*, *T. brucei* and *Leishmania* spp. to search for orthologous sequences in the *T. rangeli* genome. Because the draft assemblies of the *T. cruzi* and *T. rangeli* genomes are still fragmented, we applied a read-based analysis to estimate the copy numbers of members of these families. Three single-copy genes that are known to have two distinct alleles in the *T. cruzi* CL Brener genome were also included in this analysis to validate our estimations. We found that the *T. rangeli* genome contains a smaller number of copies of three gene families, the MASPs, Mucins and Trans-sialidases, which are known to be present in far greater numbers in *T. cruzi*. Conversely, high copy numbers of amastin and *kmp-11* are present in the *T. rangeli* genome compared to *T. cruzi* (Table 2).

T. cruzi amastins are small surface glycoproteins containing approximately 180 amino acids encoded by a gene family that has been subdivided into α-, β-, γ-, and δ-amastins and which are differentially expressed during the parasite life cycle [69,70]. δ-amastins are mainly expressed by *T. cruzi* and *Leishmania* sp. intracellular amastigotes, a developmental stage that has not been observed during *T. rangeli* life cycle. Surprisingly, whereas *T. cruzi* has 27 copies of amastin genes, we estimate that 72 copies belonging to α-, β- and δ- amastin subfamilies are present in *T. rangeli*. Since the function of these proteins are still unknown, the study of their expression pattern and the significance of the

Table 2. Comparative number of genes per multicopy gene family in *T. rangeli* and *T. cruzi*.

Gene Family	*T. rangeli*	*T. cruzi*
	SC-58	**CL Brener**
MASP	50	1465
GP63	444	449
Trans-sialidases	120	1481
Amastins	72	27
DGF	422	569
KMP-11	148	40
Tuzin	34	83
RHS	689	777
Mucin	15	992
msh6	2	2
msh2	2	2
gpi8	2	2

doi:10.1371/journal.pntd.0003176.t002

expansion of this gene family in *T. rangeli* may shed new light into the role of these trypanosomatid specific surface glycoproteins.

Also in contrast to *T. cruzi* CL Brener strain, where forty alleles of genes encoding KPM-11 are present, there are 148 members in the KMP-11 in the *T. rangeli* genome. KMP-11 is a 92-amino acid antigen present in a wide range of trypanosomatids and is a target of the host humoral immune response against *Leishmania* spp. and *T. cruzi* infections, which, in the *T. cruzi* infection, induces an immunoprotective response [71]. The *T. rangeli* KMP-11 antigen shares 97% amino acid identity with its *T. cruzi* homologue [72]. These proteins are distributed in the cytoplasm, membrane, flagellum and flagellar pocket, most likely associated with the cytoskeleton of this protozoan [73]. The expansion of this family could have provided a selective growth advantage to *T. rangeli* in its insect vector. However, as a target for the immune response in mammals, it might have contributed to the poor pathogenicity of this organism.

The copy numbers of mucin glycoprotein-encoding genes, which are one of the largest and most heterogeneous gene families found in *T. cruzi* (TcMUC), are considerably reduced in *T. rangeli*. In *T. cruzi*, these surface glycoproteins cover the cell surface of several parasite stages and form a glycocalyx barrier [74]. Read coverage analysis of the region encoding the N-terminal conserved domain of the TcMUC family suggests the presence of only 15 copies in *T. rangeli* compared to 992 copies in *T. cruzi*. This finding is in agreement with the fact that only a few mucins were identified in the *T. rangeli* transcriptome [19], and only one TrMUC peptide was found through proteomic analysis [8]. In contrast to *T. cruzi*, *T. rangeli* lacks trans-sialidase activity, retaining only sialidase activity [75]. *T. cruzi* trans-sialidases (TS) are encoded by the largest gene family present in its genome. This enzyme catalyzes the transfer of sialic acid from sialylated donors present in host cells to the terminal galactose of mucin-glycoconjugates present at the parasite cell surface [76]. As a consequence of TS activity, in *T. cruzi*, large quanitities of multiple sialylated mucins form a protective coat when the parasite is exposed to the blood and tissues of the mammalian host. The relative paucity of the TrMUC repertoire correlates with the lower parasite load of *T. rangeli* in mammalian hosts and may in turn reflect the increased susceptibility to host immune mediators of *T. rangeli* compared with *T. cruzi*.

T. cruzi TS (TcTS) is a virulence factor integral to *T. cruzi* infection of the mammalian host [76,77]. TcTS contains 12-amino acid repeats at the C-terminus, corresponding to the shed acute antigen (SAPA) [78], which is unnecessary for its activity but required for enzyme oligomerization and stability in the host [79]. This repeat is not present in *T. rangeli* sialidase sequences, and no *T. rangeli* proteins were detected in western blot assays using an anti-SAPA monoclonal antibody (unpublished results). In *T. cruzi*, TSs containing SAPA repeats are present only in infective trypomastigotes [80], while the TSs purified from epimastigotes lack the SAPA domain [81]. In addition to genes encoding the catalytic TS (subgroup Tc I), the trans-sialidase/sialidase superfamily in *T. cruzi* comprises eight subgroups, designated TcS I to VIII [82]. TcS group II encompasses proteins involved in host cell adhesion and invasion, and members of TcS group III display complement regulatory properties. The functions of the other groups are unknown, but all exhibit the conserved VTVxNVxLYNR motif, which is shared by all known TcS members [82,83]. Sialidases/sialidase-like proteins similar to TcS groups I, II and III have been reported in *T. rangeli* [19,84–86]. Here, we confirmed the presence of all TS subgroups in *T. rangeli* (Figure S1), although this parasite exhibits fewer members of the trans-sialidase/sialidase superfamily compared with *T. cruzi* (Table 2). It is therefore likely that all TS subgroups originated prior to the last common ancestor of the two species and that there was selective pressure in favor of the expansion and diversification of copies in *T. cruzi*. These observations also imply that the acquisition of SAPA repeats might have occurred after the appearance of the multiple gene family, when the *T. cruzi* ancestor gained mammalian infectivity, as proposed previously [81]. It has been suggested that the extensive sequence copy number expansion of the *T. cruzi* TS family could represent an immune evasion strategy driving the immune system to a series of spurious and non-neutralizing antibody responses [87]. It is tempting to speculate that the smaller number of copies of this large gene family found in *T. rangeli* could be related to the reduced virulence of this parasite in vertebrate hosts. Although, the expression of TS by both *T. rangeli* and *T. brucei* suggests a role for this enzyme during infections of the insect vector.

We identified 50 sequences in the *T. rangeli* genome encoding conserved domains of mucin-associated surface proteins (MASPs),

which is fewer than that found in *T. cruzi*, in which the MASPs constitute the second largest gene family [57,88]. Because MASPs are expressed at the surface of trypomastigotes and are highly polymorphic, the vast repertoire of MASP sequences present in the genome may contribute to the ability of *T. cruzi* to infect several host cell types and/or participate in host immune evasion mechanisms [89]. Changes in *T. cruzi* MASP family antigenic profiles during acute experimental infection have been established [89] and recent data has proposed a direct role for *T. cruzi* MASPs in host cell invasion (Najib El-Sayed, personal communication). Since *T. rangeli* lacks discernable ability to invade and multiply within the mammalian cells, the reduced repertoires of MASPs and of trans-sialidases in *T. rangeli* correlates may imply concerted action between these two groups of surface proteins during cell invasion and intracellular parasitism in *T. cruzi*.

Immune response evasion

African trypanosomes (*T. brucei*, *T. congolense* and *T. vivax*) are blood-living, extracellular parasites, having variable surface glycoproteins (VSG) as key elements required for immune evasion in these species [90]. As with *T. cruzi*, sequences related to the (VSG) could not be discerned through rigorous searches of the *T. rangeli* genome.

In some strains of *T. rangeli*, the epimastigotes are highly resistant to complement-mediated lysis [91]. In this context, genes showing similarity to *gp160*, a member of the large super-family of trans-sialidases identified as complement regulatory protein (CRP, or GP160) in *T. cruzi* [92], are found in the *T. rangeli* genome. However, their sizes are smaller than the corresponding *T. cruzi* genes, and considering the domain conservation observed in this family, their function as complement regulatory proteins remains unproven. Other *T. cruzi* molecules have been shown to confer resistance to complement-mediated lysis, such as calreticulin, GP58/68 and the complement C2 receptor inhibitor trispanning (CRIT) [93]. Our data showed that CRIT protein is absent in *T. rangeli*.

The *T. rangeli* kinetoplast

The mitochondrial genome of trypanosomes is a structure composed of concatenated large (maxi-) and small (mini-) circular DNAs. Minicircles are more abundant, comprising several thousand copies per genome, and are 1.6 to 1.8 kb long in *T. rangeli*. Minicircles encode gRNAs that are utilized in the editing of mitochondrial transcripts derived from maxicircle DNA, which are present at about 20 copies per genome. Minicircles exhibit heterogeneous and highly conserved regions [94]. Probes generated against conserved regions have been previously used as sensitive tools for discriminating *T. rangeli* and *T. cruzi* lineages [15].

We assembled the maxicircle of *T. rangeli* as a single contig of 25,288 bp. The length of this sequence is >10 kb longer than those sequenced from *T. cruzi* (Sylvio 15,185 bp, CL Brener 15,167 bp, Esmeraldo 14,935 bp). The maxicircle of *T. cruzi marinkellei* was found to be slightly longer (20,037 bp) than those of other *T. cruzi* strains. These length differences were attributed to variability of the repetitive region [59,95]. Similarly, the *T. rangeli* maxicircle exhibits repetitive regions of ~6 Kb that, along with non-coding regions, have increased the overall size by ~15 Kb. The coding region of the *T. rangeli* maxicircle has maintained a high degree of synteny with that of *T. cruzi* (Figure S2). We found no *in silico* evidence of additional coding sequences outside this region. Transcripts from *rRNA*, *cyb*, *coII* and *nadh* were identified in the *T. rangeli* EST database [19].

Telomeres

Three chromosome ends were identified in the genome assembled in this study (Figure S3) corresponding to telomere ends. These sequences contain previously described structures found in the terminal region of *T. rangeli* telomeres, which is characterized by a specific telomeric junction sequence in *T. rangeli* (SubTr) separating the hexameric repeats from interstitial gene sequences [96,97]. Although *T. rangeli* (SubTr) and *T. cruzi* (Tc189) telomeric junctions share very low sequence identity, related sequences have been identified in several intergenic regions in both protozoa (mainly between *gp85* genes of the trans-sialidase superfamily), suggesting that the two structures could have a common origin. According to our analysis of the sequence immediately upstream of SubTr, two types of chromosome ends could be identified (Figure 4). In the first type, SubTr is preceded by a *gp85*/trans-sialidase gene/pseudogene, while the second exhibits a copy of the mercaptopyruvate sulfurtransferase gene. The presence of this single copy gene so close to the telomeric end of a chromosome in *T. rangeli* is interesting because it is absent at this location in *T. cruzi* telomeres where only pseudogenes belonging to multigene families have been found. Notwithstanding, the chromosome ends of *T. rangeli* differ from those of *T. brucei* and *T. cruzi* in that they exhibit a simpler homogeneous organization, with short subtelomeric regions [57]. The subtelomeric region extending between SubTr and the first internal (interstitial) chromosome-specific gene in the scaffolds analyzed here is quite short (~5 kb) (Figure 4). Two of the analyzed scaffolds exhibit a high level of gene synteny with *T. cruzi* chromosome ends (CL Brener). However, this synteny is lost in subtelomeric regions due to the absence of interspersed "islands" of trans-sialidase, *dgf-1* and *rhs* genes/pseudogenes in the chromosomes of *T. rangeli* (Figure 5) [55,98]. Therefore, the differences in subtelomeric structure observed between *T. rangeli* and *T. cruzi* are consistent with the reduced number of repeated sequences found in the genome of the former and with the expansion of these sequences in the latter.

Although telomerase activity has not been reported in *T. rangeli*, a putative telomerase reverse transcriptase (*tert*) gene, along with an ortholog of a telomerase-associated protein (TEP1) gene were identified in the genome of this parasite. Taken together, the presence of the *tert* and *tep1* genes and the lack of transposable elements or blocks of non-hexameric tandem repeat sequences at chromosome ends suggest that the maintenance of telomere length in *T. rangeli* is primarily due to telomerase activity.

Among the telomere-binding proteins, a putative TTAGGG binding factor (TRF2) homolog was identified in the *T. rangeli* genome. In *T. brucei*, TRF2 interacts with double-stranded telomeric DNA as a homodimer and is essential for maintaining the telomeric G-rich overhang [99]. Moreover, homologs of the RBP38/Tc38 and RPA-1 proteins, which are single-stranded DNA-binding factors involved in telomere maintenance mechanisms, and two other putative proteins (JBP1 and JBP2) participating in base J biosynthesis [100–102] were also detected in *T. rangeli*. Base J is a hypermodified DNA base localized primarily at telomeric regions of the genome of *T. brucei*, *T. cruzi* and *Leishmania* with elusive function. However, J in chromosome-internal positions has been associated with regulation of Pol II transcription initiation in *T. cruzi* [103], whereas in *Leishmania* sp. when present at the ends of long polycistronic transcripts, it was shown to be involved in transcription termination [104].

Translation components

Most of the major components of the translation machinery found in other trypanosome and leishmania genomes are also

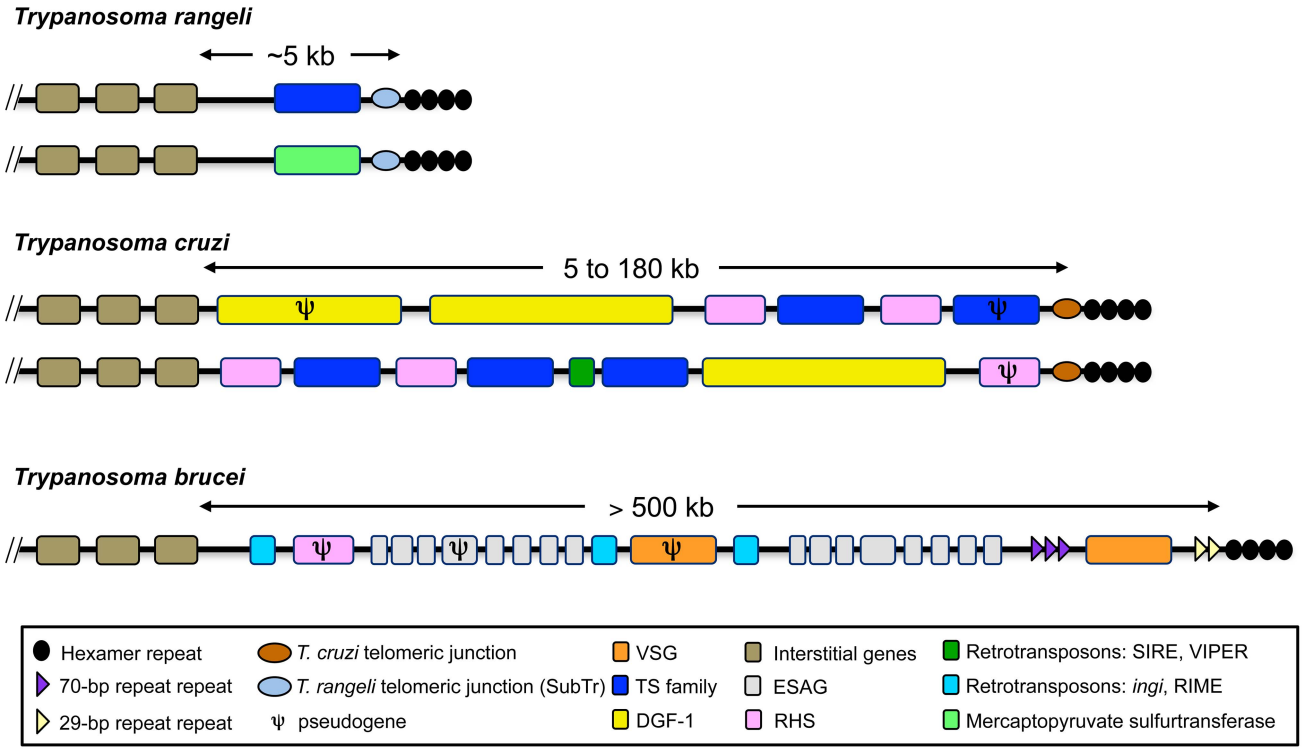


Figure 4. Representation of the telomeric and subtelomeric regions of *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and *T. brucei*. The two types of telomeres identified in *T. rangeli* and two others representing the heterogeneity of *T. cruzi* chromosome ends are shown. The size of the subtelomeric region, which extends between the telomeric hexamer repeats and the first internal core genes of the trypanosomes, is indicated below each map. Boxes indicate genes and/or gene arrays. The maps are not to scale. The *T. brucei* and *T. cruzi* maps were adapted from [55,98].
doi:10.1371/journal.pntd.0003176.g004

found in *T. rangeli* (Table S3). In general, one copy of the genes encoding the aminoacyl-tRNA synthetases is present, except for glutaminyl-tRNA synthetase and aspartyl-tRNA synthetase, which display three copies each, and leucyl-tRNA synthetase, lysyl-tRNA synthetase, valyl-tRNA synthetase, tryptophanyl-tRNA synthetase, and seryl-tRNA synthetase, which exhibit two copies each. N-terminal mitochondrial targeting signals were also predicted in some of the deduced amino acid sequences of tRNA-synthetases from *T. rangeli*.

Compared to the other trypanosome genomes, similar numbers of genes encoding ribosomal proteins and other factors involved in translation were found in *T. rangeli* with some minor variation. For example, three copies of genes encoding eukaryotic initiation factor 5A were detected in *T. rangeli*, compared to two in *T. cruzi* and one in *T. brucei*. Only one copy of elongation factor 1-beta was identified in *T. rangeli*, compared to three in *T. cruzi* and *T. brucei* and there are eight paralogs of Elongation factor 1-alpha in *T. rangeli* that are similar to the paralogous expansion observed in *T. cruzi*, with eleven copies.

RNA interference in *T. rangeli*: Is the RNAi machinery being dismantled?

In many eukaryotes, RNA interference (RNAi) is a cellular mechanism for controlling gene expression in a sequence-specific fashion. This phenomenon has been described in a large number of organisms, including *T. brucei*, *T. congolense*, *L. braziliensis* and *Giardia lamblia*. It is, however, absent in many other trypanosomes, such as *T. cruzi*, *L. major* and *L. donovani*, and other protozoa, such as *Plasmodium falciparum* [45,105–107]. Since the discovery of RNAi in *T. brucei* [108], a total of five major components of the RNAi machinery have been identified, including cytosolic (TbDCL1) and nuclear (TbDCL2) dicers, the Argonaute 1 (TbAGO1) protein, and two additional RNA Interference Factors, designated TbRIF4 and TbRIF5. It has been proposed that TbRIF4 acts in the conversion of double-stranded siRNAs into single-stranded form, and TbRIF5 functions as an essential co-factor for the TbDCL1 protein [109–112].

By searching for orthologs of components of the RNAi machinery in the *T. rangeli* genome using the *T. brucei* protein sequences as queries in *tBLASTn* analyses, we found that four of the five components of the *T. brucei* RNAi machinery are present in the *T. rangeli* genome as pseudogenes, as they exhibit one or more stop codons or frame shifts. To further evaluate whether these defective genes were a strain-specific phenomena restricted to the SC-58 strain, another strain representative of the northernmost distribution of the parasite was also assayed via PCR amplification and sequenced using Sanger sequencing chemistry. In addition to punctual differences among the strains, large deletions in *T. rangeli ago1* and *dcl1* were found (Figure S4). Among these five RNAi components, only Dicer-like 2 can be functional, since it contains insertions and deletions that do not cause frame-shifts or a premature translational stop. The *T. rangeli* Dicer-like 2 protein is 54 amino acids shorter in its N-terminal portion, exhibiting approximately 30% identity with *T. congolense* and *T. brucei* DCL2, with higher conservation in the RNaseIII domain (C-terminus) (Figure S5). The explanation for why only *dcl2* was retained in the *T. rangeli* genome is unclear. However, it has been shown in *T. brucei*, that the *dcl2* knockout cell line shows reduced levels of CIR147 (Chromosomal Internal Repeats – 147 bp long) and SLACS siRNAs (Spliced Leader

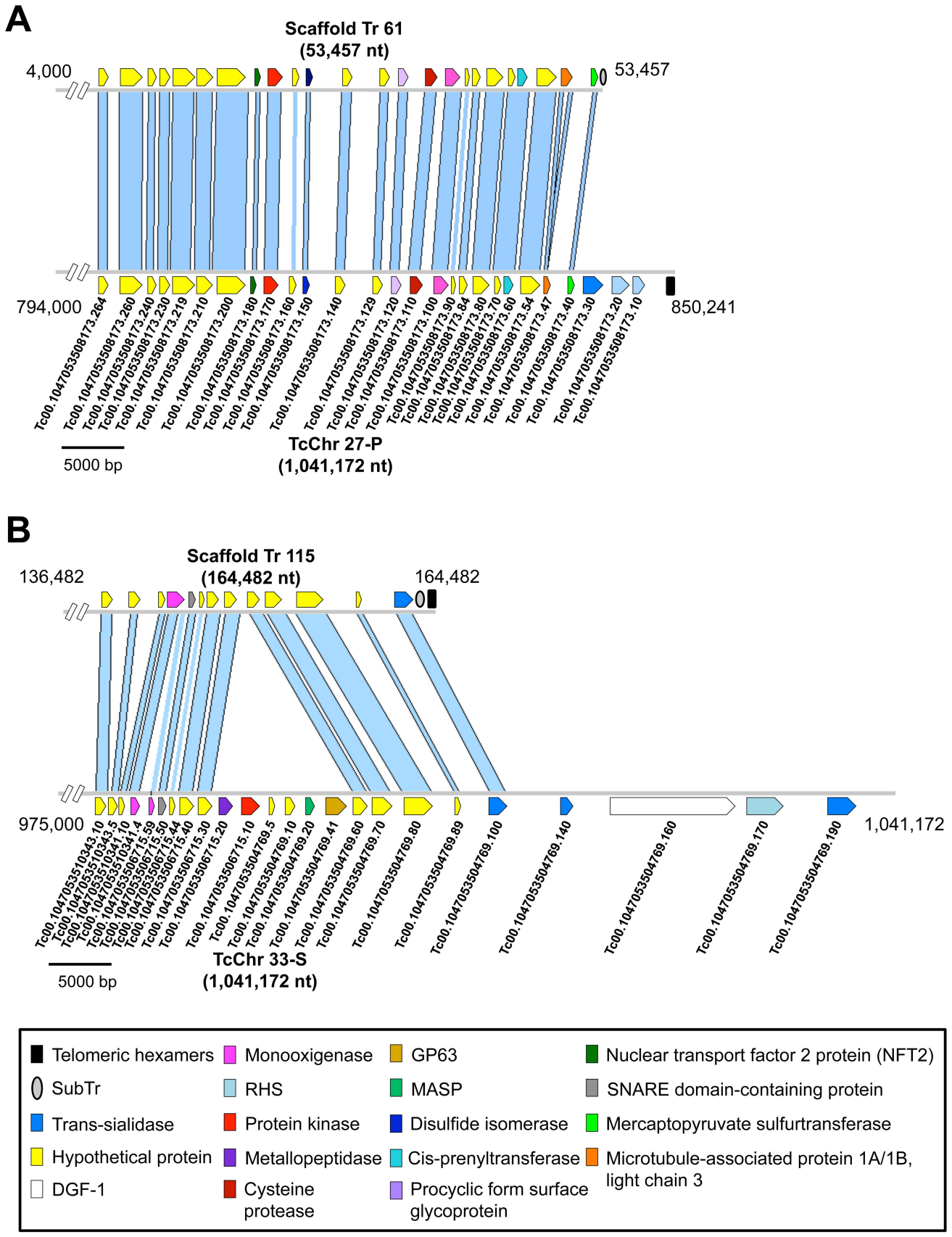

A
Scaffold Tr 61
(53,457 nt)
4,000
53,457
794,000
850,241
5000 bp
TcChr 27-P
(1,041,172 nt)
B
Scaffold Tr 115
(164,482 nt)
136,482
164,482
975,000
1,041,172
5000 bp
TcChr 33-S
(1,041,172 nt)
Telomeric hexamers
SubTr
Trans-sialidase
Hypothetical protein
DGF-1
Monooxigenase
RHS
Protein kinase
Metallopeptidase
Cysteine protease
GP63
MASP
Disulfide isomerase
Cis-prenyltransferase
Procyclic form surface glycoprotein
Nuclear transport factor 2 protein (NFT2)
SNARE domain-containing protein
Mercaptopyruvate sulfurtransferase
Microtubule-associated protein 1A/1B, light chain 3

Figure 5. Synteny analysis between *Trypanosoma rangeli* scaffolds and organized contig ends of *T. cruzi*. The blue lines represent regions of homology between the contigs. Annotated genes and other sequence characteristics are indicated by colored boxes. Arrows indicate sense transcription. **A**. Comparison between Scaffold Tr 61 (4,000–53,457 nt) and TcChr27-P (794,000–850,241 nt). **B**. Comparison between Scaffold Tr 115 (136,482–164,482 nt) and TcChr33-S (975,000–1,041,172 nt). Contig ends were oriented in the 5′ to 3′ direction according to the TriTrypDB assemblies of *T. cruzi* scaffolds. The accession numbers of the annotated sequences in the *T. cruzi* scaffolds (TriTrypDB) are displayed below the sequences.
doi:10.1371/journal.pntd.0003176.g005

Associated Conserved Sequence) and accumulation of long transcripts derived from retrotransposons (*ingi* and SLACS) [110]. This TbDCL2 knockout cell line also showed an increasing in the RNAi response to exogenous dsRNA. It is, however, difficult to speculate whether TrDCL2 plays a similar role in *T. rangeli* because the TbAGO1 ortholog is defective in this organism, and TbAGO1 knockout cells shows phenotype overlap compared to TbDCL2 -/- parasites [110].

Furthermore, a gene encoding a member of the AGO/PIWI family without the PAZ domain (conferring small RNA binding activity) was found in the *T. rangeli* genome (AUPL00000858). It encodes a protein of 1,083 amino acids that shares highest identity with *T. cruzi* (71% identical), followed by *T. brucei* (58%) and *T. congolense* (52%) throughout its entire sequence. This gene is present in the genome of all trypanosomatids, including RNAi-negative parasites, but its function is still unknown [113]. It may be that the protein encoded can work together with the TrDCL2 as part of an RNA metabolism pathway, but further work is needed to test this hypothesis.

In addition to re-sequencing PCR products corresponding to RNAi factors, the presence of a functional RNAi mechanism was investigated through transient transfections of a siRNA targeting eGFP, or a plasmid that can drive the expression of a long dsRNA targeting endogenous β-tubulin and a fluorescent marker (red fluorescent protein). In agreement with the *in silico* analysis, the transfection of eGFP-expressing cells or wild type parasites with the siRNA (Figure 6) or a plasmid encoding tubulin dsRNA, respectively, failed to inhibit eGFP expression or alter the parasite's morphology, which suggests an absence of a functional RNAi machinery in *T. rangeli*.

Protein kinases and phosphatidylinositol kinases

The *T. rangeli* genome encodes 151 eukaryotic protein kinases (ePKs), which corresponds to 1.94% of the total coding sequences in the genome. Like other trypanosomatids, *T. rangeli* lacks members of the protein tyrosine kinase (PTK), tyrosine kinase-like (TKL) and receptor guanylate cyclases (RGC) groups. *T. rangeli* displays some ePKs with predicted transmembrane domains, including nine genes, in addition to five with a signal peptide (Table S4).

The protein kinases of eukaryotes are subdivided into 8 groups according to the nomenclature of Miranda-Saavedra and Barton (2007) [114] and KinBase (http://www.kinase.com/kinbase/). In the *T. rangeli* genome, the largest group is "Other" (kinases that could not be assigned to a specific group), with 40 members, followed by the CMGC (cyclin-dependent kinases, mitogen-activated protein kinases, glycogen synthase kinase 3 and CK2-related kinases) group, with 30 members, two of which are catalytically inactive. The least represented group is the casein kinases (CK1), with only two members. The other groups display 26 members in AGC (Protein kinase A, G and C families), 22 members in CAMK (Calcium and Calmodulin-regulated kinases) and 31 members in STE (Kinases related to MAPKs activation).

The phosphatidylinositol kinases (PIK) and PIK-related proteins of *T. rangeli* are described in Table S5. These are lipid kinases that play a key role in a wide range of cellular processes, such as cell growth and survival, vesicle trafficking, cytoskeletal reorganization and chemotaxis, cell adhesion, superoxide production and glucose transport [115]. Like *T. cruzi* [38], *T. rangeli* lacks a *tor-like 2* gene, although a truncated version of this gene without the catalytic domain has been identified. The accessory domains of the PIK-related families of both *T. cruzi* and *T. rangeli* can be seen in Table S6.

In addition, *T. rangeli* possesses four phosphatidylinositol phosphate kinases (PIPK), which have not been evaluated in other trypanosomatids as yet, including in *T. cruzi*. These kinases phosphorylate already-phosphorylated phosphatidyl inositols to form phosphatidylinositol bisphosphates. The PIPK functions have been mainly established for mice and humans, which include vesicular trafficking, membrane translocation, cell adhesion, chemotaxis, the cell cycle and DNA synthesis [116].

DNA repair and recombination in *T. rangeli*

Genes that encode most of the proteins responsible for DNA repair and recombination mechanisms in other trypanosomatids were also found in *T. rangeli*, suggesting that this protozoan displays all of the known functional DNA repair pathways. In other organisms it has been demonstrated that errors generated during DNA replication can be corrected via DNA mismatch repair, involving the recruitment of heterodimers of MSH2 and

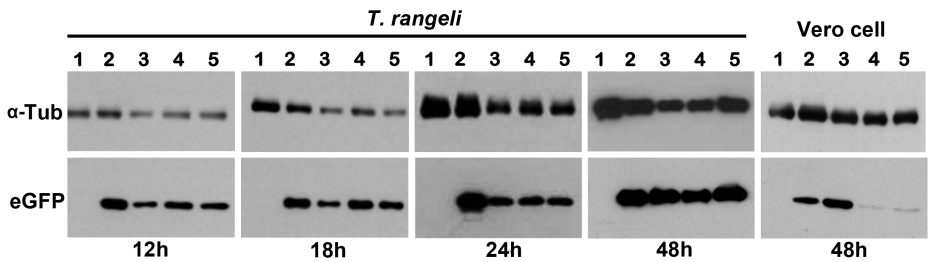


Figure 6. The RNAi machinery is not active in *Trypanosoma rangeli*. Western blot analysis of eGFP silencing via siRNA in *T. rangeli* and Vero cells expressing eGFP. For the Western blot assays, anti-GFP and anti-alpha tubulin antibodies were used. In each blot, wild-type cells (1), eGFP cells (2), eGFP cells transfected with Mock siRNA (3), eGFP cells transfected with EGFP-S1 DS Positive Control (IDT)(4) and eGFP cells transfected with eGFP antisense siRNA (5) are shown sequentially. The experiments were performed in biological triplicates.
doi:10.1371/journal.pntd.0003176.g006

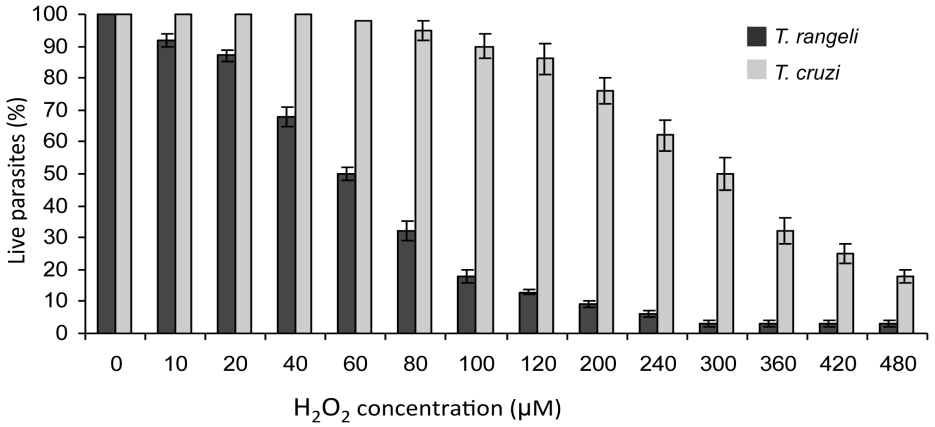


Figure 7. *In vitro* tolerance to hydrogen peroxide is significantly lower in *Trypanosoma rangeli* than *T. cruzi*. Epimatigote forms were cultured for 3 days in the presence of different concentrations of hydrogen peroxide, and the percentages of live parasites were determined using a model Z1 Coulter Counter. Mean values ± standard deviations from three independent experiments conducted in triplicate are indicated.
doi:10.1371/journal.pntd.0003176.g007

MSH3 or MSH6, which signalize MLH1 and PMS1 binding [117]. Homologs of these proteins are present in *T. rangeli*, but in common with other trypanosomatids, no homolog of PMS2 was found [56,57,60]. Different DNA base modifications can be corrected via base excision repair [118]. Sequences encoding the OGG1, UNG and MUTY DNA glycosylases were identified. However, whether the long and short pathways are functional is a question that remains to be answered because important homologs, such as LIG3, XRCC1 and PARP, are missing. Lesions that alter DNA conformation can be repaired through nucleotide excision repair (NER) [119], and as with other trypanosomatids, *T. rangeli* contains sequences encoding most of components of the NER pathway, including proteins constituting the TFIIH complex. It has been shown that in *T. brucei*, two trypanosomatid-specific subunits of TFIIH (TSP1 and TSP2) are important for parasite viability because they participate in the transcription of the splice-leader gene [120]. Both proteins are also present in *T. rangeli*, as well in *T. cruzi* and *L. major*.

DNA recombination is an essential process involved in DNA repair and in the generation of genetic variability in these parasites. No major differences in genes encoding components of DNA recombination machinery were observed between *T. rangeli* and other trypanosomatids [121]. They all exhibit genes encoding MRE11, RAD50, KU70 and 80, BRCA2 and RAD51, which play important roles in homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ). However, *T. rangeli* lacks homologs of DNA Ligase IV and XRCC4, like other trypanosomatids, indicating that it does not exhibit a functional NHEJ [122].

Antioxidant defense and stress responses in *T. rangeli*

Several antioxidant enzymes work sequentially in different subcellular compartments to promote hydroperoxide detoxification (Table S7) [123]. During its life cycle, *T. rangeli* is exposed to reactive oxygen species (ROS) in its triatomine vectors and possibly in its mammalian host. ROS are generated through oxidative metabolism and oxidative bursts in the host immune system [124]. Interestingly, epimastigotes of *T. rangeli* (SC-58 strain) are 5-fold more sensitive to hydrogen peroxide (H_2O_2) than *T. cruzi* (Y strain) forms, with IC50 values of 60 μM±2 and 300 μM±5, respectively (Figure 7). It has been reported that the membrane-bound phosphatases of *T. rangeli* are more sensitive to the addition of sublethal doses of H_2O_2 than *T. cruzi* phosphatases [125].

In trypanosomatids, the major antioxidant molecule is a low molecular weight thiol trypanothione, which maintains the intracellular environment in a reduced state, essentially through the action of trypanothione reductase [126]. Trypanothione is a conjugate formed in two-steps via the bifunctional enzyme trypanothione synthetase (TRS) using two glutathione molecules and one spermidine. Two genes coding to trypanothione synthetase, and one to trypanothione synthetase-like are present in *T. rangeli*. Considering the substrates, glutathione synthesis is observed in *T. rangeli*, as in all trypanosomatids, despite the absence of *de novo* cysteine biosynthesis [127]. However, while in *T. brucei*, *Angomonas fasciculata* and *Leishmania* spp., the spermidine is synthesized from ornithine and methionine; in *T. cruzi*, the key enzyme ornithine decarboxylase (ODC) is absent, and the parasite solely depends on polyamine uptake by transporters to synthesize trypanothione. The *odc* gene is not present in *T. rangeli*, suggesting that this parasite also requires exogenous polyamines [128].

Trypanothione reductase (TR), a key enzyme involved in antioxidant defense in trypanosomatids, is present in *T. rangeli* and shares 84% identity with the *T. cruzi* enzyme at the amino acid level. Trypanothione is maintained in its reduced form (T-SH_2) by the action of trypanothione reductase and the cofactor NADPH [126]. The reactions of the trypanothione cycle are catalyzed by tryparedoxin peroxidase (TXNPx) and ascorbate peroxidase (APX), which are responsible for the subsequent detoxification of H_2O_2 to water [126]. These enzymes use tryparedoxin and ascorbate as electron donors, respectively, which are in turn, reduced by dihydrotrypanothione.

As with other trypanosomatids, *T. rangeli* produces superoxide dismutase (SOD), an enzyme that removes excess superoxide radicals by converting them to oxygen and H_2O_2 [129]. Three *Fe-sod* genes were found in *T. rangeli*: *Fe-sod-a*, *Fe-sod-b* and a putative *Fe-sod*, sharing 90%, 88% and 84% identity with *T. cruzi* Fe-*sod* genes, respectively. Additionally, as with to *T. cruzi*, *T. rangeli* exhibits genes encoding distinct TXNPx proteins, including one cytosolic, one mitochondrial and one putative TXNPx sequence. Both enzymes possess two domains that are common to subgroup 2-Cys, and is present in antioxidant enzymes from the peroxiredoxin family [130]. The *T. rangeli* genome also contains two glutathione peroxidases (*gpx*), which act as antioxidants by reducing H_2O_2 or hydroperoxides with a high catalytic efficiency in different cellular locations [128]. In addition, enzymes related to

sensitivity of nifurtimox or benzonidazol were identified in *T. rangeli*, including nitroreductase and prostaglandin F2 synthetase.

An ortholog of the ascorbate peroxidase gene from *T. cruzi* (*apx*) is present as a pseudogene in *T. rangeli*, as it exhibits a premature stop codon or frame shifts. Interestingly, this enzyme, which is a class I heme-containing enzyme, is present in photosynthetic microorganisms, plants and some trypanosomatids, such as *Leishmania* spp. and *T. cruzi*, but is absent in *T. brucei* [131–133]. In *T. cruzi*, ascorbate peroxidase and glutathione-dependent peroxidase II metabolize H_2O_2 and lipid hydroperoxides in the endoplasmic reticulum. It can be speculated that the higher sensibility of *T. rangeli* to H_2O_2 compared to *T. cruzi* could be related to the absence of ascorbate peroxidase activity. Proteomic analyses conducted in *T. cruzi* have demonstrated upregulation of components of the parasite antioxidant network during metacyclogenesis, including TcAPX, reinforcing the importance of the antioxidant enzymes for successful infection [134,135]. Wilkinson et al. [136] suggested that *T. brucei* may not require ascorbate-based antioxidant protection because, as an extracellular parasite, it is not exposed to the oxidative challenge from host immune cells produced in response to intracellular infection of *T. cruzi* or *Leishmania* spp. Thus, the limited capability of *T. rangeli* to respond to oxidative stress could be related to the inability of this parasite to infect and multiply inside vertebrate host cells. This observation may suggest a distinct replication site for this parasite in the mammalian host, similar to the extracellular cycle of *T. brucei*.

In Table S8, the genes encoding the stress response proteins of *T. rangeli* are presented. A large set of heat shock protein genes is found in the genome of this parasite, occasionally displaying a reduced copy number compared with *T. cruzi*. Similarly to *T. cruzi*, the *T. rangeli* genome contains 17 *hsp70* genes, 13 of which are cytosolic, while 3 are mitochondrial, and one localized to the endoplasmic reticulum. On the other hand, only one *hsp85* and *hsp20* genes were found in the *T. rangeli* genome, compared to 6 and 11 copies in *T. cruzi*, respectively. The large number of *hsp40* genes observed in kinetoplastids (68 copies in *T. cruzi*) [137] is also reduced in *T. rangeli* (24 copies).

Thus, where the reduced repertoire of transialidases and MASPs may correlate with diminished ability to enter mammalian cells, it can be speculated that the reduced number of genes related to different cellular stress responses provides for a more limited capability of *T. rangeli* to respond to oxidative stress and that this in turn corresponds with an apparent inability to survive and multiply within mammalian cells.

Conclusions

At 24 Mb (haploid), the *T. rangeli* genome is the shortest and least variable genome from the mammalian-infective trypanosomatids to date. Our elucidation of its sequence both answers and poses a variety of intriguing questions about the biology of a trypanosome which is infectious but non-pathogenic to humans and which is carried by triatomine bugs and sympatrically distributed with *T. cruzi*, but which shows a salivarian rather than a stercorian route for infection. Based on phylogenomic analysis, *T. rangeli* is undoubtedly positioned as a stercorarian parasite, chromosome structure and progressive loss of RNAi machinery in this lineage lend support to this interpretation and the results presented here corroborate previous results based on distinct nuclear and mitochondrial markers. The different evolutionary path of this trypanosome species is, though, writ large on its genome by a differential in the preponderance of gene duplication and divergence, particularly at the telomeres, with reduced diversity in genes known to be associated with infection of the mammalian host such as transsialidases, MASPs and oxidative stress and rather more diversity in other non-telomeric gene families such as KMP-11s and amastins which may imply roles for these families in vector interactions. It is interesting to consider to what extent the *T. rangeli-Rhodnius* vector species co-evolution of salivary gland colonization (and anterior transmission) is an example of parallel or convergent evolution with the colonization of the tsetse salivary gland by African trypanosomes, and to what extent the apparatus for this phenotype was already present in a progenitor. Our release of the *T. rangeli* genome casts further light on the evolutionary origins and relationships of trypanosomes, and provides a resource for better understanding the function of genes and factors related to the virulence and pathogenesis of trypanosomiasis and with which to address unknown aspects of the *T. rangeli* life cycle in mammalian hosts.

Supporting Information

Figure S1 Mapping of *T. rangeli* sialidase sequences on a multidimensional scaling (MDS) plot of *T. cruzi* TcS protein sequences. The MDS shows the pattern of dispersion of the *T. cruzi* TcS sequences, as proposed by [82]. All individual *T. rangeli* reads were searched against the *T. cruzi* predicted proteome using the *BLASTx* algorithm, and all reads whose best hits were against *T. cruzi* TcS genes were retained. TcS genes showing at least 50% coverage with *T. rangeli* sialidase genes are displayed as black dots. TcS groupI - blue; TcS groupII - dark green; TcS groupIII - light blue; TcS groupIV - magenta; TcS groupV - red; TcS groupVI - gray; TcS groupVII - orange and TcS groupVIII - purple.
(TIF)

Figure S2 Schematic representation of the *T. rangeli* maxicircle. Colored arrows represent the orientation of each maxicircle gene. ND indicates NADH dehydrogenase genes; Cyb indicates cytochrome B; COI/COII indicates cytochrome c oxidase. Numbers are in base pairs.
(TIF)

Figure S3 Schematic representation of the comparative analysis of the ends of the assembled scaffolds from the *T. rangeli* genome and previously reported telomere sequences [97].
(TIF)

Figure S4 Alignment of *ago1*, *dcl1*, *rif4*, and *rif5* pseudogenes from *T. rangeli* Choachí and SC-58.
(PDF)

Figure S5 Conservation of DCL-2 in RNAi-positive trypanosomes and *T. rangeli*. Panel **A** shows a multiple alignment of potential DCL2 proteins from *T. b. gambiense*, *T. b. brucei*, *T. congolense* and *T. rangeli* generated by MultiAlin. Amino acids in red are conserved in all sequences. Panel **B** summarizes the identity shared by the potential DCL2 proteins. The lysine and glutamic acid residues highlighted in green are part of the RNaseIII domain of DICERs, which have been shown to be important for the catalytic activity of TbDCL2 [110].
(PDF)

Table S1 Comparison of satellite DNA found in *T. rangeli* strain SC-58 genomic and transcriptomic libraries with the *T. cruzi* haploid genome (CL Brener strain).
(DOCX)

Table S2 Comparative distribution of microsatellites found in *T. rangeli* genomic (G) and transcriptomic (T) datasets.
(XLSX)

Table S3 Comparative number of translation process-related proteins from distinct kinetoplastid species.
(DOC)

Table S4 *Trypanosoma rangeli* ePKs with predicted transmembrane domains.
(DOCX)

Table S5 Phosphatidylinositol and related kinase proteins identified from the predicted proteomes of *T. rangeli* and *T. cruzi*.
(DOCX)

Table S6 Accessory domains present in PIK-related proteins in *T. rangeli* and *T. cruzi* (Model 5).
(DOCX)

Table S7 Antioxidant enzymes of trypanosomatids.
(DOCX)

Table S8 The stress response proteins of *T. rangeli*.
(DOC)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PHS GW DCB JFdSF SMRT WDD ATRdV ECG. Performed the experiments: PHS GW AG EBP DDL FML JFdSF SMFM ECG. Analyzed the data: PHS GW AZ KMM CET DCB DB EL EBP MHdM DDL FML GAV JFdSF KMT LGPdA MS MFO MAC OdLC RMN GRL SMRT RS SMFM AJR TCMS TAdOM TPU VGS WDD CTL BA ATRdV ECG. Contributed reagents/materials/analysis tools: PHS DCB JFdSF MAC SMRT SMFM BA ATRdV ECG. Wrote the paper: PHS DCB JFdSF KMT SS MS SMRT BA ATRdV ECG.

References

1. D'Alessandro-Bacigalupo A, Saravia NG (1992) Trypanosoma rangeli. In: Kreier JP, Baker EJR, editors. Parasitic Protozoa. 2nd edition. London: Academic Press. pp. 1–54.
2. Grisard EC, Steindel M, Guarneri AA, Eger-Mangrich I, Campbell DA, et al. (1999) Characterization of Trypanosoma rangeli strains isolated in Central and South America: an overview. Mem Inst Oswaldo Cruz 94: 203–209.
3. Guhl F, Vallejo GA (2003) Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli Tejera, 1920: an updated review. Mem Inst Oswaldo Cruz 98: 435–442.
4. de Moraes MH, Guarneri AA, Girardi FP, Rodrigues JB, Eger I, et al. (2008) Different serological cross-reactivity of Trypanosoma rangeli forms in Trypanosoma cruzi-infected patients sera. Parasit Vectors 1: 20.
5. Vasquez JE, Krusnell J, Orn A, Sousa OE, Harris RA (1997) Serological diagnosis of Trypanosoma rangeli infected patients. A comparison of different methods and its implications for the diagnosis of Chagas' disease. Scandinavian journal of immunology 45: 322–330.
6. Guhl F, Hudson L, Marinkellle CJ, Jaramillo CA, Brifge D (1987) Clinical Trypanosoma rangeli infections as a complication of Chaga's disease. Parasitology 94: 9.
7. Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES (2007) Evaluation of serological tests to identify Trypanosoma cruzi infection in humans and determine cross-reactivity with Trypanosoma rangeli and Leishmania spp. Clinical and vaccine immunology 14: 1045–1049.
8. Wagner G, Eiko Yamanaka L, Moura H, Denardin Luckemeyer D, Schlindwein AD, et al. (2013) The Trypanosoma rangeli trypomastigote surfaceome reveals novel proteins and targets for specific diagnosis. J Proteomics 82: 52–63.
9. Añez N (1984) Studies on Trypanosoma rangeli Tejera, 1920. VII–Its effect on the survival of infected triatomine bugs. Mem Inst Oswaldo Cruz 79: 249–255.
10. Tobie EJ (1965) Biological factors influencing transmission of Trypanosoma rangeli by Rhodnius prolixus. J Parasitol 51: 837–841.
11. Maia Da Silva F, Junqueira AC, Campaner M, Rodrigues AC, Crisante G, et al. (2007) Comparative phylogeography of Trypanosoma rangeli and Rhodnius (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. Mol Ecol 16: 3361–3373.
12. Maia da Silva F, Marcili A, Lima L, Cavazzana M Jr., Ortiz PA, et al. (2009) Trypanosoma rangeli isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. Acta Trop 109: 199–207.
13. Maia da Silva F, Rodrigues AC, Campaner M, Takata CS, Brigido MC, et al. (2004) Randomly amplified polymorphic DNA analysis of Trypanosoma rangeli and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. Parasitology 128: 283–294.
14. Steindel M, Dias Neto E, Pinto CJ, Grisard EC, Menezes CL, et al. (1994) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of Trypanosoma rangeli strains. J Eukaryot Microbiol 41: 261–267.
15. Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Lozano LE, Sanchez JL, et al. (2002) kDNA markers define two major Trypanosoma rangeli lineages in Latin-America. Acta Trop 81: 77–82.
16. Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA (2009) Triatominae-Trypanosoma cruzi/T. rangeli: Vector-parasite interactions. Acta Trop 110: 137–147.
17. Urrea DA, Carranza JC, Cuba CA, Gurgel-Goncalves R, Guhl F, et al. (2005) Molecular characterisation of Trypanosoma rangeli strains isolated from Rhodnius ecuadoriensis in Peru, R. colombiensis in Colombia and R. pallescens in Panama, supports a co-evolutionary association between parasites and vectors. Infect Genet Evol 5: 123–129.
18. Urrea DA, Guhl F, Herrera CP, Falla A, Carranza JC, et al. (2011) Sequence analysis of the spliced-leader intergenic region (SL-IR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) of Trypanosoma rangeli strains isolated from Rhodnius ecuadoriensis, R. colombiensis, R. pallescens and R. prolixus suggests a degree of co-evolution between parasites and vectors. Acta Trop 120: 59–66.
19. Grisard EC, Stoco PH, Wagner G, Sincero TC, Rotava G, et al. (2010) Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite Trypanosoma rangeli. Mol Biochem Parasitol 174: 18–25.
20. Cano MI, Gruber A, Vazquez M, Cortes A, Levin MJ, et al. (1995) Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the Trypanosoma cruzi genome project. Mol Biochem Parasitol 71: 273–278.
21. Souza RT, Lima FM, Barros RM, Cortez DR, Santos MF, et al. (2011) Genome size, karyotype polymorphism and chromosomal evolution in Trypanosoma cruzi. PLoS One 6: e23042.
22. Motta MC, Martins AC, de Souza SS, Catta-Preta CM, Silva R, et al. (2013) Predicting the proteins of Angomonas deanei, Strigomonas culicis and their respective endosymbionts reveals new aspects of the trypanosomatidae family. PloS one 8: e60209.
23. Almeida LG, Paixao R, Souza RC, Costa GC, Barrientos FJ, et al. (2004) A System for Automated Bacterial (genome) Integrated Annotation–SABIA. Bioinformatics 20: 2832–2833.
24. Saier MH, Jr., Reddy VS, Tamang DG, Vastermark A (2014) The transporter classification database. Nucleic acids research 42: D251–258.
25. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25: 3389–3402.
26. Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, et al. (2005) Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. Cytogenet Genome Res 110: 462–467.
27. Price AL, Jones NC, Pevzner PA (2005) De novo identification of repeat families in large genomes. Bioinformatics 21 Suppl 1: i351–358.
28. Huang X, Madan A (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. Genome Res 9: 868–877.
29. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, et al. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Mol Syst Biol 7: 539.
30. Roure B, Rodriguez-Ezpeleta N, Philippe H (2007) SCaFoS: a tool for selection, concatenation and fusion of sequences for phylogenomics. BMC Evol Biol 7 Suppl 1: S2.
31. Felsenstein J (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author, Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, United States of America.
32. Schmidt HA, Strimmer K, Vingron M, von Haeseler A (2002) TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. Bioinformatics 18: 502–504.
33. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4: 406–425.
34. Strimmer K, von Haeseler A (1996) Quartet Puzzling: A Quartet Maximum-Likelihood Method for Reconstructing Tree Topologies. Mol Biol Evol 13: 964–969.
35. Page RD (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput Appl Biosci 12: 357–358.
36. Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Brief Bioinform 9: 299–306.
37. Martin DM, Miranda-Saavedra D, Barton GJ (2009) Kinomer v. 1.0: a database of systematically classified eukaryotic protein kinases. Nucleic Acids Res 37: D244–250.
38. Bahia D, Oliveira LM, Lima FM, Oliveira P, Silveira JF, et al. (2009) The TryPIKinome of five human pathogenic trypanosomatids: Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania major, Leishmania braziliensis and Leishmania infantum–new tools for designing specific inhibitors. Biochem Biophys Res Commun 390: 963–970.

39. Bahia D, Oliveira LM, Mortara RA, Ruiz JC (2009) Phosphatidylinositol-and related-kinases: a genome-wide survey of classes and subtypes in the Schistosoma mansoni genome for designing subtype-specific inhibitors. Biochem Biophys Res Commun 380: 525–530.
40. Bosotti R, Isacchi A, Sonnhammer EL (2000) FAT: a novel domain in PIK-related kinases. Trends Biochem Sci 25: 225–227.
41. Marone R, Cmiljanovic V, Giese B, Wymann MP (2008) Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. Biochim Biophys Acta 1784: 159–185.
42. Benson G (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. Nucleic Acids Res 27: 573–580.
43. Tammi MT, Arner E, Andersson B (2003) TRAP: Tandem Repeat Assembly Program produces improved shotgun assemblies of repetitive sequences. Comput Methods Programs Biomed 70: 47–59.
44. Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res 16: 10881–10890.
45. DaRocha WD, Otsu K, Teixeira SM, Donelson JE (2004) Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in Trypanosoma cruzi. Mol Biochem Parasitol 133: 175–186.
46. Ersfeld K (2011) Nuclear architecture, genome and chromatin organisation in Trypanosoma brucei. Res Microbiol 162: 626–636.
47. Minning TA, Weatherly DB, Flibotte S, Tarleton RL (2011) Widespread, focal copy number variations (CNV) and whole chromosome aneuploidies in Trypanosoma cruzi strains revealed by array comparative genomic hybridization. BMC Genomics 12: 139.
48. Downing T, Imamura H, Decuypere S, Clark TG, Coombs GH, et al. (2011) Whole genome sequencing of multiple Leishmania donovani clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. Genome Res 21: 2143–2156.
49. Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, et al. (2011) Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of Leishmania. Genome Res 21: 2129–2142.
50. Cabrine-Santos M, Ferreira KA, Tosi LR, Lages-Silva E, Ramirez LE, et al. (2009) Karyotype variability in KP1(+) and KP1(−) strains of Trypanosoma rangeli isolated in Brazil and Colombia. Acta Trop 110: 57–64.
51. Henriksson J, Solari A, Rydaker M, Sousa OE, Pettersson U (1996) Karyotype variability in Trypanosoma rangeli. Parasitology 112 (Pt 4): 385–391.
52. Toaldo CB, Steindel M, Sousa MA, Tavares CC (2001) Molecular karyotype and chromosomal localization of genes encoding beta-tubulin, cysteine proteinase, hsp 70 and actin in Trypanosoma rangeli. Mem Inst Oswaldo Cruz 96: 113–121.
53. Ghedin E, Bringaud F, Peterson J, Myler P, Berriman M, et al. (2004) Gene synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids. Mol Biochem Parasitol 134: 183–191.
54. Martinez-Calvillo S, Sunkin SM, Yan S, Fox M, Stuart K, et al. (2001) Genomic organization and functional characterization of the Leishmania major Friedlin ribosomal RNA gene locus. Mol Biochem Parasitol 116: 147–157.
55. El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, et al. (2005) Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. Science 309: 404–409.
56. Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, et al. (2005) The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei. Science 309: 416–422.
57. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, et al. (2005) The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease. Science 309: 409–415.
58. Franzen O, Ochaya S, Sherwood E, Lewis MD, Llewellyn MS, et al. (2011) Shotgun sequencing analysis of Trypanosoma cruzi I Sylvio X10/1 and comparison with T. cruzi VI CL Brener. PLoS Negl Trop Dis 5: e984.
59. Franzen O, Talavera-Lopez C, Ochaya S, Butler CE, Messenger LA, et al. (2012) Comparative genomic analysis of human infective Trypanosoma cruzi lineages with the bat-restricted subspecies T. cruzi marinkellei. BMC genomics 13: 531.
60. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, et al. (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. Science 309: 436–442.
61. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, et al. (2007) Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. Nat Genet 39: 839–847.
62. Elias MC, Vargas NS, Zingales B, Schenkman S (2003) Organization of satellite DNA in the genome of Trypanosoma cruzi. Mol Biochem Parasitol 129: 1–9.
63. Biemont C, Vieira C (2006) Genetics: junk DNA as an evolutionary force. Nature 443: 521–524.
64. Fraser MJ, Jr. (2012) Insect transgenesis: current applications and future prospects. Annu Rev Entomol 57: 267–289.
65. Largaespada DA (2003) Generating and manipulating transgenic animals using transposable elements. Reprod Biol Endocrinol 1: 80.
66. Damasceno JD, Beverley SM, Tosi LR (2010) A transposon toolkit for gene transfer and mutagenesis in protozoan parasites. Genetica 138: 301–311.
67. Fonager J, Franke-Fayard BM, Adams JH, Ramesar J, Klop O, et al. (2011) Development of the piggyBac transposable system for Plasmodium berghei and its application for random mutagenesis in malaria parasites. BMC genomics 12: 155.
68. Kim HS, Park SH, Gunzl A, Cross GA (2013) MCM-BP is required for repression of life-cycle specific genes transcribed by RNA polymerase I in the mammalian infectious form of Trypanosoma brucei. PloS one 8: e57001.
69. Teixeira SM, Russell DG, Kirchhoff LV, Donelson JE (1994) A differentially expressed gene family encoding "amastin," a surface protein of Trypanosoma cruzi amastigotes. J Biol Chem 269: 20509–20516.
70. Kangussu-Marcolino MM, de Paiva RM, Araujo PR, de Mendonca-Neto RP, Lemos L, et al. (2013) Distinct genomic organization, mRNA expression and cellular localization of members of two amastin sub-families present in Trypanosoma cruzi. BMC microbiology 13: 10.
71. Diez H, Lopez MC, Del Carmen Thomas M, Guzman F, Rosas F, et al. (2006) Evaluation of IFN-gamma production by CD8 T lymphocytes in response to the K1 peptide from KMP-11 protein in patients infected with Trypanosoma cruzi. Parasite Immunol 28: 101–105.
72. Diez H, Thomas MC, Uruena CP, Santander SP, Cuervo CL, et al. (2005) Molecular characterization of the kinetoplastid membrane protein-11 genes from the parasite Trypanosoma rangeli. Parasitology 130: 643–651.
73. Diez H, Sarmiento L, Caldas ML, Montilla M, Thomas Mdel C, et al. (2008) Cellular location of KMP-11 protein in Trypanosoma rangeli. Vector Borne Zoonotic Dis 8: 93–96.
74. Buscaglia CA, Campo VA, Frasch AC, Di Noia JM (2006) Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. Nature reviews Microbiology 4: 229–236.
75. Amaya MF, Buschiazzo A, Nguyen T, Alzari PM (2003) The high resolution structures of free and inhibitor-bound Trypanosoma rangeli sialidase and its comparison with T. cruzi trans-sialidase. J Mol Biol 325: 773–784.
76. Dc-Rubin SS, Schenkman S (2012) Trypanosoma cruzi trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease. Cell Microbiol 14: 1522–1530.
77. Butler CE, de Carvalho TM, Grisard EC, Field RA, Tyler KM (2013) Trans-sialidase Stimulates Eat Me Response from Epithelial Cells. Traffic 14: 853–869.
78. Frasch AC (1994) Trans-sialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between Trypanosoma cruzi and the mammalian host. Parasitology 108 Suppl: S37–44.
79. Buscaglia CA, Campetella O, Leguizamon MS, Frasch AC (1998) The repetitive domain of Trypanosoma cruzi trans-sialidase enhances the immune response against the catalytic domain. The Journal of infectious diseases 177: 431–436.
80. Affranchino JL, Pollevick GD, Frasch AC (1991) The expression of the major shed Trypanosoma cruzi antigen results from the developmentally-regulated transcription of a small gene family. FEBS Lett 280: 316–320.
81. Briones MR, Egima CM, Schenkman S (1995) Trypanosoma cruzi trans-sialidase gene lacking C-terminal repeats and expressed in epimastigote forms. Mol Biochem Parasitol 70: 9–17.
82. Freitas LM, dos Santos SL, Rodrigues-Luiz GF, Mendes TA, Rodrigues TS, et al. (2011) Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of Trypanosoma cruzi reveal an undetected level of complexity. PLoS One 6: e25914.
83. Schenkman S, Eichinger D, Pereira ME, Nussenzweig V (1994) Structural and functional properties of Trypanosoma trans-sialidase. Annu Rev Microbiol 48: 499–523.
84. Anez-Rojas N, Peralta A, Crisante G, Rojas A, Anez N, et al. (2005) Trypanosoma rangeli expresses a gene of the group II trans-sialidase superfamily. Mol Biochem Parasitol 142: 133–136.
85. Buschiazzo A, Campetella O, Frasch AC (1997) Trypanosoma rangeli sialidase: cloning, expression and similarity to T. cruzi trans-sialidase. Glycobiology 7: 1167–1173.
86. Pena CP, Lander N, Rodriguez E, Crisante G, Anez N, et al. (2009) Molecular analysis of surface glycoprotein multigene family TrGP expressed on the plasma membrane of Trypanosoma rangeli epimastigotes forms. Acta Trop 111: 255–262.
87. Pitcovsky TA, Buscaglia CA, Mucci J, Campetella O (2002) A functional network of intramolecular cross-reacting epitopes delays the elicitation of neutralizing antibodies to Trypanosoma cruzi trans-sialidase. J Infect Dis 186: 397–404.
88. Bartholomeu DC, Cerqueira GC, Leao AC, daRocha WD, Pais FS, et al. (2009) Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen Trypanosoma cruzi. Nucleic Acids Res 37: 3407–3417.
89. dos Santos SL, Freitas LM, Lobo FP, Rodrigues-Luiz GF, Mendes TA, et al. (2012) The MASP family of Trypanosoma cruzi: changes in gene expression and antigenic profile during the acute phase of experimental infection. PLoS Negl Trop Dis 6: e1779.
90. Salmon D, Vanwalleghem G, Morias Y, Denoeud J, Krumbholz C, et al. (2012) Adenylate cyclases of Trypanosoma brucei inhibit the innate immune response of the host. Science 337: 463–466.
91. de Sousa MA, Dos Santos Pereira SM, Dos Santos Faissal BN (2012) Variable sensitivity to complement-mediated lysis among Trypanosoma rangeli reference strains. Parasitol Res 110: 599–608.
92. Norris KA, Schrimpf JE, Szabo MJ (1997) Identification of the gene family encoding the 160-kilodalton Trypanosoma cruzi complement regulatory protein. Infect Immun 65: 349–357.
93. Cestari Idos S, Evans-Osses I, Freitas JC, Inal JM, Ramirez MI (2008) Complement C2 receptor inhibitor trispanning confers an increased ability to

resist complement-mediated lysis in Trypanosoma cruzi. J Infect Dis 198: 1276–1283.
94. 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: 245–253.
95. Westenberger SJ, Cerqueira GC, El-Sayed NM, Zingales B, Campbell DA, et al. (2006) Trypanosoma cruzi mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. BMC genomics 7: 60.
96. Cabrine-Santos M, Ramirez LE, Lages-Silva E, de Souza BF, Pedrosa AL (2011) Sequencing and analysis of chromosomal extremities of Trypanosoma rangeli in comparison with Trypanosoma cruzi lineages. Parasitol Res 108: 459–466.
97. Chiurillo MA, Peralta A, Ramirez JL (2002) Comparative study of Trypanosoma rangeli and Trypanosoma cruzi telomeres. Mol Biochem Parasitol 120: 305–308.
98. Moraes Barros RR, Marini MM, Antonio CR, Cortez DR, Miyake AM, et al. (2012) Anatomy and evolution of telomeric and subtelomeric regions in the human protozoan parasite Trypanosoma cruzi. BMC genomics 13: 229.
99. Li B, Espinal A, Cross GA (2005) Trypanosome telomeres are protected by a homologue of mammalian TRF2. Mol Cell Biol 25: 5011–5021.
100. Cliffe LJ, Kieft R, Southern T, Birkeland SR, Marshall M, et al. (2009) JBP1 and JBP2 are two distinct thymidine hydroxylases involved in J biosynthesis in genomic DNA of African trypanosomes. Nucleic Acids Res 37: 1452–1462.
101. Lira CB, Giardini MA, Neto JL, Conte FF, Cano MI (2007) Telomere biology of trypanosomatids: beginning to answer some questions. Trends Parasitol 23: 357–362.
102. Luciano P, Coulon S, Faure V, Corda Y, Bos J, et al. (2012) RPA facilitates telomerase activity at chromosome ends in budding and fission yeasts. EMBO J 31: 2034–2046.
103. Ekanayake D, Sabatini R (2011) Epigenetic regulation of polymerase II transcription initiation in Trypanosoma cruzi: modulation of nucleosome abundance, histone modification, and polymerase occupancy by O-linked thymine DNA glucosylation. Eukaryotic cell 10: 1465–1472.
104. van Luenen HG, Farris C, Jan S, Genest PA, Tripathi P, et al. (2012) Glucosylated hydroxymethyluracil, DNA base J, prevents transcriptional readthrough in Leishmania. Cell 150: 909–921.
105. Baum J, Papenfuss AT, Mair GR, Janse CJ, Vlachou D, et al. (2009) Molecular genetics and comparative genomics reveal RNAi is not functional in malaria parasites. Nucleic Acids Res 37: 3788–3798.
106. Inoue N, Otsu K, Ferraro DM, Donelson JE (2002) Tetracycline-regulated RNA interference in Trypanosoma congolense. Mol Biochem Parasitol 120: 309–313.
107. Lye LF, Owens K, Shi H, Murta SM, Vieira AC, et al. (2010) Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. PLoS Pathog 6: e1001161.
108. Ngo H, Tschudi C, Gull K, Ullu E (1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in Trypanosoma brucei. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 14687–14692.
109. Barnes RL, Shi H, Kolev NG, Tschudi C, Ullu E (2012) Comparative genomics reveals two novel RNAi factors in Trypanosoma brucei and provides insight into the core machinery. PLoS Pathog 8: e1002678.
110. Patrick KL, Shi H, Kolev NG, Ersfeld K, Tschudi C, et al. (2009) Distinct and overlapping roles for two Dicer-like proteins in the RNA interference pathways of the ancient eukaryote Trypanosoma brucei. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 17933–17938.
111. Shi H, Djikeng A, Tschudi C, Ullu E (2004) Argonaute protein in the early divergent eukaryote Trypanosoma brucei: control of small interfering RNA accumulation and retroposon transcript abundance. Mol Cell Biol 24: 420–427.
112. Shi H, Tschudi C, Ullu E (2006) An unusual Dicer-like1 protein fuels the RNA interference pathway in Trypanosoma brucei. RNA 12: 2063–2072.
113. Garcia Silva MR, Tosar JP, Frugier M, Pantano S, Bonilla B, et al. (2010) Cloning, characterization and subcellular localization of a Trypanosoma cruzi argonaute protein defining a new subfamily distinctive of trypanosomatids. Gene 466: 26–35.
114. Miranda-Saavedra D, Barton GJ (2007) Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases. Proteins 68: 893–914.
115. Wymann MP, Pirola L (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. Biochim Biophys Acta 1436: 127–150.
116. Schramp M, Hedman A, Li W, Tan X, Anderson R (2012) PIP Kinases from the Cell Membrane to the Nucleus. Sub-cellular biochemistry 58: 25–59.
117. Schofield MJ, Hsieh P (2003) DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. Annual review of microbiology 57: 579–608.
118. Parsons JL, Dianov GL (2013) Co-ordination of base excision repair and genome stability. DNA repair 12: 326–333.
119. Kamileri I, Karakasilioti I, Garinis GA (2012) Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. Trends in genetics 28: 566–573.
120. Lee JH, Jung HS, Gunzl A (2009) Transcriptionally active TFIIH of the early-diverged eukaryote Trypanosoma brucei harbors two novel core subunits but not a cyclin-activating kinase complex. Nucleic acids research 37: 3811–3820.
121. Horn D, McCulloch R (2010) Molecular mechanisms underlying the control of antigenic variation in African trypanosomes. Current opinion in microbiology 13: 700–705.
122. Passos-Silva DG, Rajao MA, Nascimento de Aguiar PH, Vieira-da-Rocha JP, Machado CR, et al. (2010) Overview of DNA Repair in Trypanosoma cruzi, Trypanosoma brucei, and Leishmania major. Journal of nucleic acids 2010: 840768.
123. Wilkinson SR, Temperton NJ, Mondragon A, Kelly JM (2000) Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in Trypanosoma cruzi. J Biol Chem 275: 8220–8225.
124. Muller S, Liebau E, Walter RD, Krauth-Siegel RL (2003) Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. Trends Parasitol 19: 320–328.
125. Cosentino-Gomes D, Russo-Abrahao T, Fonseca-de-Souza AL, Ferreira CR, Galina A, et al. (2009) Modulation of Trypanosoma rangeli ecto-phosphatase activity by hydrogen peroxide. Free Radic Biol Med 47: 152–158.
126. Turrens JF (2004) Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. Mol Aspects Med 25: 211–220.
127. Romero I, Tellez J, Yamanaka LE, Steindel M, Romanha AJ, et al. (2014) Transsulfuration is an active pathway for cysteine biosynthesis in Trypanosoma rangeli. Parasit Vectors 7: 197.
128. Castro H, Tomas AM (2008) Peroxidases of trypanosomatids. Antioxidants & redox signaling 10: 1593–1606.
129. Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G (1987) Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. CRC Crit Rev Biochem 22: 111–180.
130. Pineyro MD, Pizarro JC, Lema F, Pritsch O, Cayota A, et al. (2005) Crystal structure of the tryparedoxin peroxidase from the human parasite Trypanosoma cruzi. J Struct Biol 150: 11–22.
131. Nogueira FB, Rodrigues JF, Correa MM, Ruiz JC, Romanha AJ, et al. (2012) The level of ascorbate peroxidase is enhanced in benznidazole-resistant populations of Trypanosoma cruzi and its expression is modulated by stress generated by hydrogen peroxide. Mem Inst Oswaldo Cruz 107: 494–502.
132. Raven EL (2003) Understanding functional diversity and substrate specificity in haem peroxidases: what can we learn from ascorbate peroxidase? Nat Prod Rep 20: 367–381.
133. Wilkinson SR, Obado SO, Mauricio IL, Kelly JM (2002) Trypanosoma cruzi expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 13453–13458.
134. Piacenza L, Alvarez MN, Peluffo G, Radi R (2009) Fighting the oxidative assault: the Trypanosoma cruzi journey to infection. Curr Opin Microbiol 12: 415–421.
135. Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Martinez A, Radi R (2012) Trypanosoma cruzi antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. Antioxid Redox Signal 19: 723–734.
136. Wilkinson SR, Prathalingam SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM (2005) Vitamin C biosynthesis in trypanosomes: a role for the glycosome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 11645–11650.
137. Folgueira C, Requena JM (2007) A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. FEMS Microbiol Rev 31: 359–377.