

CARLOS GUSTAVO REGIS DA SILVA

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL
DO GENE *Rad51* DE *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

**ORIENTADOR
CARLOS RENATO MACHADO**

**CO-ORIENTADORA
SANTUZA MARIA RIBEIRO TEIXEIRA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

MARÇO / 2002

Silva, Carlos Gustavo Regis da.
Clonagem e caracterização funcional do gene *rad51* de *Trypanosoma cruzi*.
[manuscrito] / Carlos Gustavo Regis da Silva. – 2002.
71 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Carlos Renato Machado. Co-orientadora: Santuza Maria
Ribeiro Teixeira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto
de Ciências Biológicas.

1. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 2. Reparo do DNA - Teses. 3. Bioquímica –
Teses. 4. Rad51 recombinase. I. Machado, Carlos Renato. II. Teixeira,
Santuza Maria Ribeiro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto
de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.213.6



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE CARLOS GUSTAVO REGIS DA SILVA. Ao primeiro dia do mês de março de 2002 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada pelo Colegiado do Curso em 28 de janeiro de 2002, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO GENE Rad51 DE *Trypanosoma cruzi*" requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia. Abrindo a sessão o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Renato Machado da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a argüição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Vânia Ferreira Prado da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dr. Evanguedes Kalapothakis da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira – co-orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dr. Carlos Renato Machado – orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais. Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 01 de março de 2002.

Dra. Vânia Ferreira Prado – UFMG

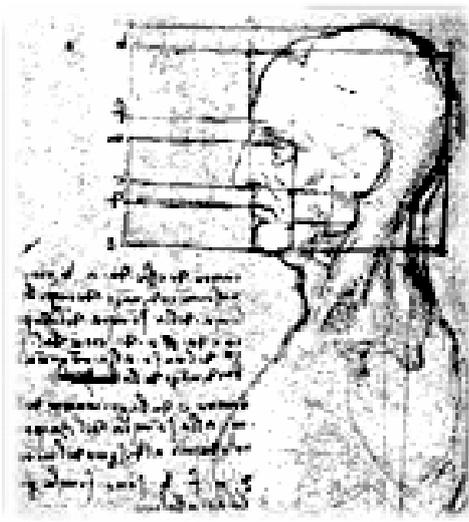
Prof. Marcelo Matos Santoro
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em
Bioquímica e Imunologia - ICB-UFMG

Dr. Evanguedes Kalapothakis – UFMG

Dr. Carlos Renato Machado – Orientador - UFMG

LOCAL DE EXECUÇÃO

Laboratório de Genética Bioquímica,
Laboratório de Imunologia e Biologia Celular de Parasitos
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas – UFMG
Auxílio financeiro CNPq



" Meu êxito como cientista (...) foi determinado (...) por qualidades e condições complexas e diversificadas. Destas as mais importantes foram o amor à ciência; uma paciência ilimitada para refletir longamente sobre qualquer assunto; zelo para observar e coleccionar dados; e uma boa porção de imaginação e senso comum."

Darwin, 1911

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos

- Ao meu orientador Carlos Renato Machado pela paciência, valiosos ensinamentos e persistência. Pelo seu espírito científico incansável e estilo de orientação invejáveis que muito facilitou nossa convivência durante a realização deste trabalho.
- À minha co-orientadora Santuza Maria Ribeiro Texeira pela atenção, ensinamentos e sugestões que muito contribuíram para o meu desenvolvimento profissional.
- Aos Prof. Sérgio Pena, Profa. Glória Franco e Profa. Andrea M. Macedo pelas sugestões e por compartilhar seus conhecimentos científicos durante a realização desse trabalho.
- Aos alunos Luiz Augusto Pinto, Wanderson D. da Rocha, Daniela C. Bartholomeu que me ajudam a caminhar no mundo da biologia molecular.
- Às técnicas Neuza, Míriam e Kátia que viabilizam a execução dos trabalhos no laboratório.
- A Jacqueline pela convivência, por sempre estar pronta a ajudar, e também pelos seqüenciamentos.
- A todos os alunos e ex-alunos do Laboratório de Genética Bioquímica (Andréia Machado, Juliana Pimenta, Renato, Analina, Débora Naves, Patrícia, Carlos Eduardo, Aléxia, Flávia, Francisco Lobo, Rinaldo, Eduardo, Marina, Juliana Alves e Carolina) pela convivência.
- Aos alunos do Laboratório de Imunologia e Biologia Celular de Parasitos (Rosiane, Jane, Júnia, Camila e Fabiano) por estarem sempre prontos a me ajudar.
- À agência financiadora CNPq.
- A Débora “Aline”, Simone e Jorge pela amizade, pelas risadas e momentos alegres no laboratório.
- Aos meus colegas do curso de bases.

AGRADECIMENTOS

- A Celise por estar sempre disposta a ajudar na resolução de problemas burocráticos.
- Aos Prof. Cristiano e Profa. Valéria que me introduziram no mundo da ciência e cujos ensinamentos sempre estarão comigo.
- Aos meus amigos especiais André, Rodrigo e Othon que me ajudam a superar as minhas dificuldades pessoais e que sempre estão presentes para me alegrar.
- Aos meus amigos Carla, Juliane Alves, Juliana Guimarães, Breno, Cristiane e Renata cujas vozes sempre me trazem boas lembranças do passado.
- A Charles pelo apoio constante, amizade sincera e cumplicidade eterna.
- À minha amiga Ilma com quem sempre posso contar em todas as situações.
- Aos meus pais e a minha irmã pela compreensão, incentivo e amor incondicional.

Dedico este trabalho aos meus pais
e a minha irmã, mesmo distantes
sempre presentes.

	PÁG
Índice de Figuras e Tabelas	iii
Lista de Abreviaturas	v
Resumo	vi
Abstract	vii
1 – Introdução	01
1.1 – O reparo de quebra de dupla fita	02
1.2 – Junção das regiões terminais	02
1.3 – Reparo por recombinação homóloga	04
1.4 – As proteínas Rad51 e RecA	07
1.5 – Replicação e recombinação	08
1.6 – O <i>Trypanosoma cruzi</i>	08
1.7 – O reparo de DNA em <i>T. cruzi</i>	10
1.8 – O processo de recombinação em <i>T. cruzi</i>	11
2 – Objetivos - Geral e específicos	12
3 – Material e Métodos	13
3.1 – Meio de cultura e linhagens de bactérias	13
3.2 – Meios de cultura e cepa de levedura	14
3.3 – Amplificação de DNA de <i>T. cruzi</i> por PCR	14
3.4 – Transformação de <i>E. coli</i> competentes	15
3.5 – PCR de colônias de bactérias transformadas	16
3.6 – Extração de plasmídeos pela técnica de “minipep”	16
3.7 – Reações de seqüenciamento	17
3.8 – Extração de DNA genômico de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	17
3.9 – "Southern blot"	18
3.10 – Extração de RNA total de <i>T. cruzi</i>	19

3.11 – "Northern blot"	19
3.12 – Marcação de sondas com ^{32}P e purificação da sonda radioativa	20
3.13 – Ensaio de mutagênese em <i>E. coli</i>	21
3.14 – Transformação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
3.15 – Construção de linhagem de <i>S. cerevisiae</i> nocaute para o gene <i>Rad51</i>	22
3.16 – Atividade funcional do gene <i>TcRad51</i> em <i>S. cerevisiae</i>	24
3.17 – Análises filogenéticas do gene <i>TcRad51</i>	25
4 – Resultados	27
4.1 – Análises de ESTs homólogas ao gene <i>Rad51</i> de <i>T. brucei</i>	27
4.2 – Amplificação e clonagem do gene <i>Rad51</i> do <i>T. cruzi</i>	32
4.3 – Obtenção da seqüência completa do gene <i>TcRad51</i>	33
4.4 – Análise da proteína TcRad51	36
4.5 – Organização do gene <i>TcRad51</i> no genoma do <i>T. cruzi</i>	39
4.6 – Expressão do gene <i>TcRad51</i> nas formas epimastigota, tripomastigota e amastigota de <i>T. cruzi</i>	42
4.7 – Atividade funcional do gene <i>TcRad51</i> em <i>E. coli</i>	43
4.8 – Atividade funcional do gene <i>TcRad51</i> em <i>S. cerevisiae</i>	45
4.9 – Evolução molecular do gene <i>TcRad51</i> em <i>T. cruzi</i>	48
5 – Discussão	53
6 – Conclusões	61
7 – Perspectivas	63
Bibliografia	64
Anexos	70

Nº		PÁG
01	Ilustração esquemática do processo de junção das regiões terminais do DNA.	04
02	Ilustração esquemática do processo de recombinação e reparo de quebra de dupla fita.	05
03	Ilustração esquemática do processo de troca entre fitas simples e dupla de DNA promovidas pela proteína RecA.	06
04	Comparação entre as proteínas Rad51 humana (HsRad51) e RecA de <i>E. coli</i> .	07
05	Pesquisa de homologia em banco de ESTs utilizando a seqüência do gene <i>Rad51</i> de <i>Trypanosoma brucei</i> através do programa blast n.	28
06	Pesquisa de homologia em banco de ESTs utilizando a seqüência da EST AI057807 através do programa blast n.	29
07	Pesquisa de homologia utilizando a seqüência da EST AI057807 através do programa blast x.	29
08	Pesquisa de homologia utilizando a seqüência da EST AI562578 através do programa blast x.	30
09	Pesquisa de homologia utilizando a seqüência da EST AI667881 através do programa blast x.	31
10	Alinhamento entre a proteína Rad51 de <i>T. brucei</i> , e as ESTs de <i>T. cruzi</i> .	32
11	Gel de acrilamida 6% corado pela prata, indicando a presença de um produto de amplificação de cerca de 1kb correspondente ao gene <i>TcRad51</i> .	33
12	Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, indicando a digestão com <i>EcoRI</i> do vetor pGEM-Teasy contendo o gene <i>TcRad51</i> .	34
13	Seqüência completa do gene e da proteína Rad51 de <i>T. cruzi</i> .	35
14	Resultado da pesquisa de homologia utilizando a seqüência do gene <i>TcRad51</i> através do programa blast x.	36

15	Alinhamento das seqüências da proteína Rad51.	38
16	Regiões da proteína TcRad51 caracterizadas pelo programa InterProScan.	39
17	Organização gênica de <i>TcRad51</i> .	41
18	Auto-radiografia do Northern blot utilizando como sonda o gene <i>TcRad51</i>	43
19	Construção do cassete <i>His3</i> .	46
20	Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo indicando a amplificação do fragmento de 840pb utilizando DNA da colônia 18 como molde.	47
21	<i>S. cerevisiae</i> crescidas em meio mínimo com glicose ou galactose	48
22	Alinhamento da seqüência de nucleotídeos de alelos <i>TcRad51</i> das cepas 1005, 239, 167, 115, Tulahuén (Tula), 222, 231, Colombiana (Col), RB1 e D7.	50
23	Alinhamento da seqüência de proteínas de alelos <i>TcRad51</i> das cepas 1005, 239, 167, 115, Tulahuén (Tula), 222, 231, Colombiana (Col), RB1 e D7.	51
24	Árvore filogenética baseada em polimorfismos na seqüência de nucleotídeos do gene <i>TcRad51</i> .	52

TABELAS

I	Características genotípicas das cepas de <i>E. coli</i> AB1157 e DH5- α .	13
II	Iniciadores <i>TcRad51.10</i> e <i>TcRad51.21</i> utilizados para amplificação do gene <i>TcRad51</i> por PCR.	15
III	Iniciadores utilizados na construção e seleção de nocaute de <i>S. cerevisiae</i> nocaute para o gene <i>ScRad51</i> .	23
IV	Taxa de mutação* de bactérias AB1157 e DH5- α expressando ou não <i>TcRad51</i> .	44

AP	Apirimidínicos/Apurínicos
ATP	Adenosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNA-PK	Fosfocinase dependente de DNA
DSB	“Double strand breakage”, quebra da dupla fita
EST	“ <i>Expressed Sequence Tags</i> ”, etiquetas de seqüências expressas
GTP	Guanosina trifosfato
ID	“Identity”, identidade
IPTG	Isopropil tio- β -D-galactosídeo
JRT	Junção das regiões terminais
Kb	Kilobases
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
pb	Pares de base
PCR	“Polymerase chain reaction”, reação em cadeia da polimerase
qsp	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SSC	Tampão salina citrato de sódio
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

O *Trypanosoma cruzi* é um parasito pertencente à ordem *Kinetoplastida* e o agente causador da doença de Chagas. Nesse organismo, é observado um baixo grau de divergência entre alelos. Esse fenômeno é pouco comum em organismos de reprodução clonal como o *T. cruzi* e ocorre devido a rearranjos gênicos como o processo de recombinação. Esse processo também representa uma das vias de reparo de quebras na dupla fita de DNA. O produto do gene *Rad51* é uma das principais proteínas envolvidas nesses processos. Essa enzima apresenta a atividade de recombinase, que resulta na troca entre as fitas de duas moléculas de DNA. Neste trabalho, isolamos e caracterizamos o gene *Rad51* de *T. cruzi* (*TcRad51*). A análise de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) homólogas ao gene *Rad51* de *T. brucei* permitiu a identificação das regiões C-terminal e N-terminal do produto de *TcRad51* e, conseqüentemente, possibilitou a construção de iniciadores específicos para clonagem da janela aberta de leitura desse gene pela técnica da PCR. A seqüência de nucleotídeos foi obtida e utilizada na identificação da seqüência da proteína. Pesquisas em banco de dados revelaram que a proteína TcRad51 tem homologia com Rad51 de diversos organismos e também com outras recombinases. Além disso, foram identificados alguns domínios que são necessários para a função de recombinase. A organização de *TcRad51*, estudada pela técnica de *Southern blot*, indica que há duas cópias do gene no genoma do *T. cruzi*. Ensaio de *Northern blot* mostraram que um único RNA mensageiro é expresso em todas as formas de vida do parasito. O produto desse gene foi capaz de aumentar a taxa de mutação quando expresso em *E. coli* selvagem, fornecendo evidências de que a proteína TcRad51 interage com DNA bacteriano induzindo uma resposta do sistema S.O.S. Estudos com *Saccharomyces cerevisiae* nocauteada para o gene *ScRad51* mostraram que estas são incapazes de crescer na presença da proteína TcRad51, provavelmente porque esta se liga ao DNA nos locais de quebra da dupla fita no DNA, mascarando-as e impedindo seu reparo. Além dos experimentos voltados para a caracterização desse gene, verificamos também aspectos de evolução molecular em dez cepas de *T. cruzi*. O que observamos foi um alto grau de conservação de um fragmento de 359 pares de bases do gene *TcRad51*. A árvore filogenética baseada nesses fragmentos indica que essas cepas se dividem em três grupos. Além disso, duas cepas, 167 e 115, possuem alelos do gene *Rad51* que pertencem a dois grupos diferentes indicando que elas são híbridas. Os resultados aqui apresentados abrem uma nova perspectiva para o entendimento da biologia do parasito *T. cruzi* por identificar um importante gene envolvido no processo de recombinação e reparo de quebra dupla na fita do DNA.

Trypanosoma cruzi is a parasite of the order *Kinetoplastida* that causes Chagas' disease. A low level of allele divergence is observed in this organism. Although such high levels of homozygosity are not expected in an organism without sexual reproduction, this phenomenon may be promoted by genetic rearrangements during a recombination process. Recombination is also part of a pathway of double strand breakage repair, and the product of the *Rad51* gene is one of the major proteins involved in this process. This enzyme has recombinase activity, which results in strand exchange between two DNA molecules. In this work, we have isolated and characterized the *Rad51* gene from *T. cruzi* (*TcRad51*). A search in the EST database for sequences with homology with *T. brucei Rad51* gene allowed us to design a set of primers used to clone the open reading frame for the *Rad51* of *T. cruzi* by PCR. The nucleotide sequence was obtained and used to identify the protein sequence. Sequence comparisons in databases showed that TcRad51 protein has homology with Rad51 of several organisms and with other recombinases. Also, some domains that are necessary to recombinase function were identified. Southern blot analysis showed that the *TcRad51* is presented in two copies in the *T. cruzi* genome. Northern blot analyses indicated that one messenger RNA is expressed in all forms of the life cycle of this parasite. When expressed in wild type *E. coli*, the product of the *TcRad51* gene was able to increase the mutation rate, probably by inducing the S.O.S. response to TcRad51 DNA interaction. *Rad51* knockout *Saccharomyces cerevisiae* was unable to grow in the presence of TcRad51 protein. This phenotype may be caused by the incapacity of this strain to repair double strand breakage, which is masked by TcRad51 protein. In addition to the characterization of the *TcRad51* gene, we investigated aspects of molecular evolution in ten strains of *T. cruzi*. A high degree of conservation was observed in the 5'-terminal (359 base pairs fragment) of *TcRad51* gene. These strains were divided in three groups according to the phylogenetic analyses based on this fragment. Furthermore, two strains, 167 and 115, may be considered as hybrids because they have alleles that belong to two different groups. The results presented here open new perspectives to the understanding of an important aspect of the *T. cruzi* biology related to DNA metabolism.

INTRODUÇÃO

Durante o processo evolutivo, o ácido desoxirribonucléico (DNA) foi selecionado para carregar a informação genética. A dupla fita dessa molécula possui duas características fundamentais para a sobrevivência de um organismo. Primeiro, a partir de uma única molécula é possível se gerar duas outras através de um processo de replicação semiconservativa. Segundo, a dupla fita contém informação que pode ser transcrita em uma mensagem que, posteriormente, pode ser traduzida em uma proteína. O material genético representado pelas moléculas de DNA é conhecido como genoma. Modificações podem ser inseridas no genoma de um organismo uma vez que o DNA é susceptível a alterações químicas causadas por agentes ambientais, por agentes produzidos dentro da própria célula ou por erros ocorridos durante o processo de replicação. Essas modificações são conhecidas como mutações. As mutações podem ter como efeito alterações na seqüência de proteínas que podem ser neutras, toleradas pelo organismo ou mesmo letais. Portanto, as mutações podem levar à variabilidade fenotípica ou à morte. Uma vez que a variabilidade fenotípica é necessária para a ocorrência do processo de seleção natural, o ideal para as espécies é que a taxa de mutação seja suficiente para gerar certa variabilidade e não o bastante para gerar a morte dos indivíduos. Assim, muito cedo durante o processo evolutivo surgiram proteínas capazes de manter uma taxa de mutações condizente com a manutenção da integridade e de certa estabilidade no genoma de um organismo. Essas proteínas participam no metabolismo do DNA realizando o reparo do DNA.

Considerando-se apenas espécies cujo genoma foi completamente seqüenciado ou está em andamento, o número de genes de reparo identificados é da ordem de 10^2 (Aravind *et al.*, 1999). Espera-se que novos genes sejam identificados. Os mecanismos de reparo têm sido divididos em cinco vias: (i) reversão direta da lesão, (ii) reparo por excisão de base; (iii) reparo por excisão de nucleotídeos; (iv) reparo de erros de pareamento e (v) reparo de quebra da dupla fita. O conhecimento a cerca dessas vias tem sido produzido em estudos com poucas espécies. A maior parte das informações é relacionada a bactérias (*E. coli*), leveduras (*S. cerevisiae*), camundongos e homem. Entretanto, tendo em vista a função biológica fundamental do sistema de reparo, novos estudos tem surgido também em outros organismos.

Alvos em potencial para estudos dos sistemas de reparo são os parasitos. Além de informações básicas sobre a biologia desses organismos, estes estudos poderão permitir a descoberta de novas terapias. Tendo essa perspectiva em vista, a cerca de três anos e meio, iniciamos em nosso laboratório a clonagem e caracterização de genes envolvidos no reparo de DNA do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. O primeiro gene identificado por nossa equipe foi o *TcMSH2* (Augusto-Pinto *et al.*, 2001). Nesse trabalho, isolamos e caracterizamos o gene *Rad51* do *T. cruzi* (*TcRad51*) que participa no processo de recombinação e reparo de quebra da dupla-fita.

1.1. O Reparo de quebra da dupla fita

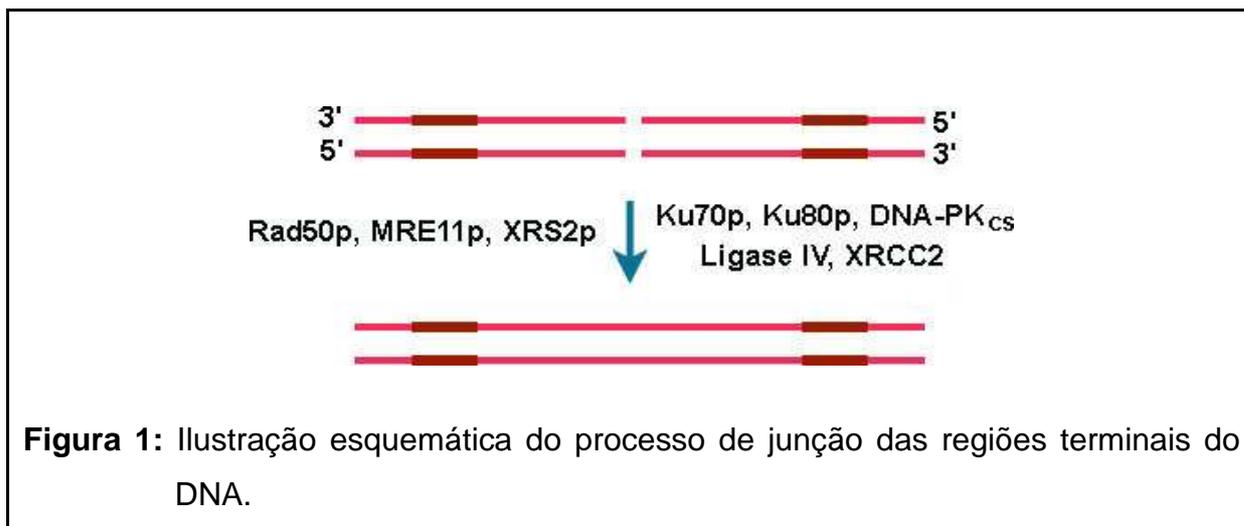
As quebras da dupla fita de DNA (DSBs, do inglês “double strand breaks”) podem ocorrer durante o processo de replicação de uma célula pela ação de radicais livres de origem endógena ou podem ser causadas por agentes exógenos como a radiação ionizante. A persistência dessas quebras pode levar a fragmentação cromossômica, translocações ou deleções, resultando em letalidade para a célula ou em ativação de oncogenes e iniciação de um processo de carcinogênese (Kanaar *et al.*, 1998). Portanto, durante o processo evolutivo as células desenvolveram pelo menos dois mecanismos para o reparo desse tipo de lesão: junção das regiões terminais (JRT) e o reparo por recombinação. No primeiro caso, as fitas originadas da quebras são religadas não sendo necessária nenhuma ou apenas uma pequena homologia entre elas. Já o reparo por recombinação é dependente da região correspondente à quebra no cromossomo homólogo ou na cromátide irmã, sendo um processo conceitualmente bem mais complicado. A relevância desses dois processos no reparo das quebras da dupla-fita pode variar de organismo para organismo e depende também da fase do ciclo em que a célula se encontra. Nossos estudos têm como objetivo o entendimento do processo de recombinação em *T. cruzi*, devido a sua importância nos mecanismos de reparo de DSBs e também nos processos de variabilidade genotípica e fenotípica.

1.2. Junção das regiões terminais

O conhecimento a respeito da JRT é limitado. Três genes, cujos produtos participam dessa via, foram isolados a partir de células de ovário de hamster chinês

(CHO) que apresentavam sensibilidade a radiação ionizante (Jeggo, 1997). São eles *XRCC4*, *XRCC5* e *XRCC7*. Os dois últimos codificam subunidades da proteína cinase dependente de DNA (DNA-PK). Nessa via, Ku80, codificada pelo gene *XRCC5*, e Ku70, identificada a partir de estudos bioquímicos, formam um heterodímero que se liga as regiões terminais quebradas da dupla fita (Ramsdem & Gellert, 1998). A formação desse heterodímero protege o DNA contra degradação (Liang & Jasin, 1996) e também teria função de alinhar as fitas quebradas. Além disso, ele recruta um complexo formado pela ligase IV e o produto do gene *XRCC4*, e recruta também a subunidade catalítica da DNA-PK para formar o complexo DNA-PK. O complexo ligase IV e *XRCC4*, estimulado por sua ligação ao heterodímero, faria a ligação intermolecular das fitas quebradas (Critclow *et al.*, 1997; Sibanda *et al.*, 2001). Embora a subunidade catalítica da DNA-PK possa fosforilar uma grande variedade de proteínas *in vitro*, não são bem conhecidos os alvos do complexo formado *in vivo* (Anderson & Carter, 1996). Uma possível função desse complexo seria fosforilar proteínas próximas a quebra, promovendo uma parada no ciclo celular ou mesmo acionando a transcrição de outros genes envolvidos no processo de reparo de DSBs. Análises de ligações de plasmídeos lineares por extratos celulares de células humanas indicam que a inibição da unidade catalítica da DNA-PK seria responsável por uma diminuição na eficiência de ligação dos plasmídeos (Baumann & West, 1998), por isso a DNA-PK pode ter outras funções.

Para que ocorra a ligação da DSB é necessário o processamento das fitas de DNA, entretanto, o mecanismo pelo qual esse processamento é alcançado ainda é pouco conhecido. Em *S. cerevisiae*, além dos homólogos de Ku70, Ku80, *XRCC4* e DNA ligase IV, foram identificadas três genes envolvidos na JRT. *MRE11*, *RAD50* e *XRS2* são epistáticos com os genes *ScKU70* e *ScKU80*. A deleção desses genes leva a uma redução na eficiência de ligação de regiões terminais (Ogawa *et al.*, 1995; Sibanda *et al.*, 1998). Experimentos bioquímicos mostram que a proteína humana codificada pelo homólogo de *MRE11* possui atividade de exonuclease 3'-5', sugerindo que o complexo formado pelo produto desses três genes seria responsável pelo processamento das fitas quebradas antes de ocorrer a ligação (Paull & Gellert, 1998).



Genes envolvidos na estruturação da cromatina também se mostraram importantes no mecanismo de JRT. A deleção de *SIR2*, *SIR3* e *SIR4* em *S. cerevisiae* leva a inibição da ligação das fitas (Boulton & Jackson, 1998; Tsukamoto *et al.*, 1997). Os produtos desses genes são necessários para a formação de uma estrutura na cromatina que inibe o processo de transcrição na região dos telômeros. Essa mesma estrutura deve facilitar a ligação das regiões terminais da fita quebrada. A figura 1 esquematiza o processo de JRT em *S. cerevisiae*.

1.3. Reparo por recombinação homóloga

Análises genéticas permitiram o isolamento de genes envolvidos no reparo por recombinação em *S. cerevisiae*. Através da busca por células sensíveis a radiação ou deficientes no processo de recombinação meiótica, foram isolados dez genes pertencentes ao grupo epistático *Rad52*: *Rad50*, *Rad51*, *Rad52*, *Rad54*, *Rad55*, *Rad57*, *Rad59*, *MRE11* e *XRS2*. Homólogos de *Rad50*, *Rad51*, *Rad52*, *Rad54* e *MRE11* foram isolados em camundongos e humanos. A importância dessa via é apoiada pelo alto grau de conservação desses genes em eucariotos. As fitas quebradas são processadas por nucleases e helicases (Figura 2). Em seguida é formado um complexo protéico composto por *Rad51*, *Rad52*, *Rad54*, *Rad55/57* e *RP-A*. Essas proteínas seriam responsáveis pela invasão da fita simples danificada na dupla fita do cromossomo homólogo ou da cromátide irmã, formando uma estrutura similar às junções de Holliday observadas no processo de recombinação

em bactérias. Por fim, a estrutura seria resolvida pela ação de DNA polimerases, ligases e resolvases.

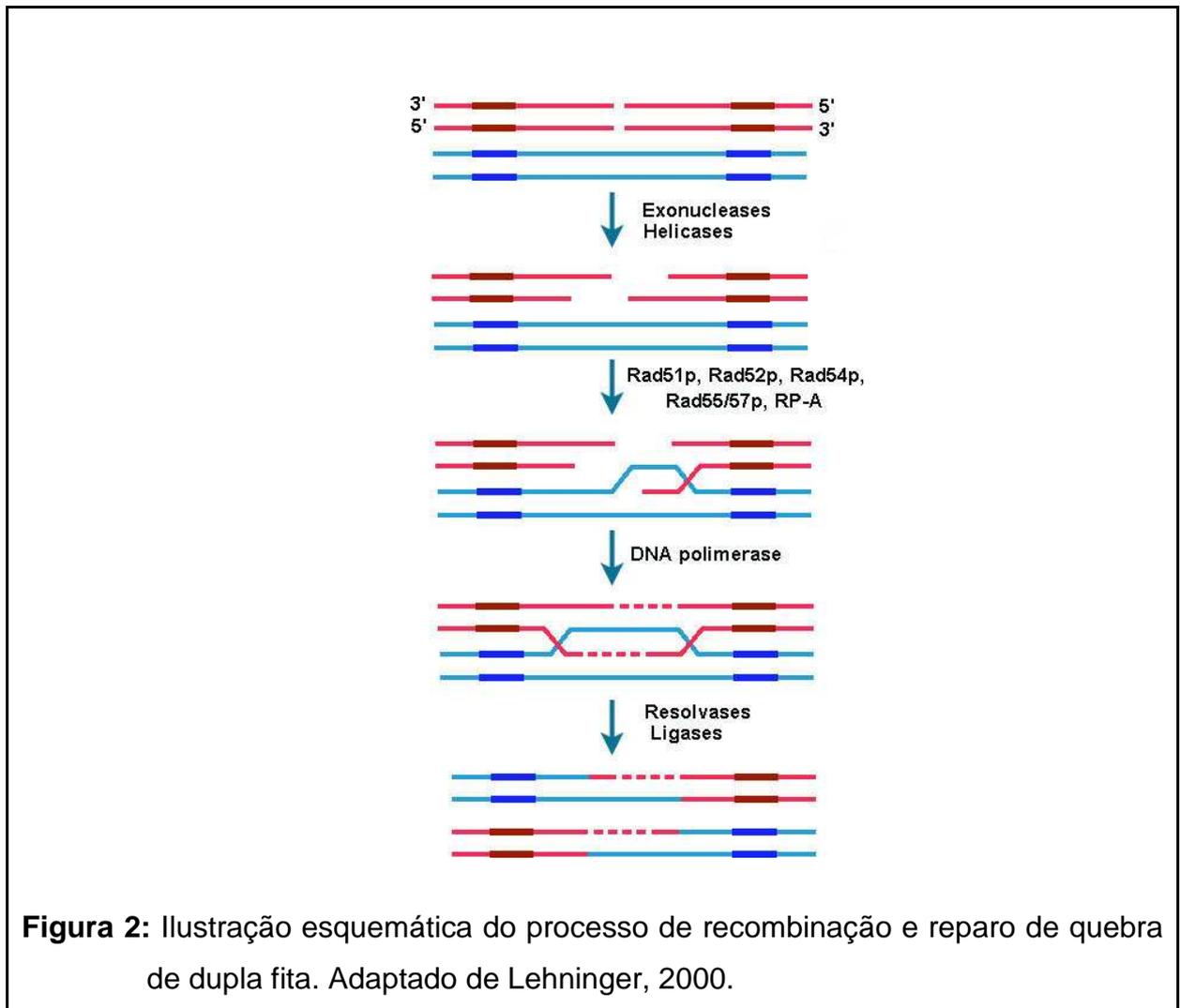
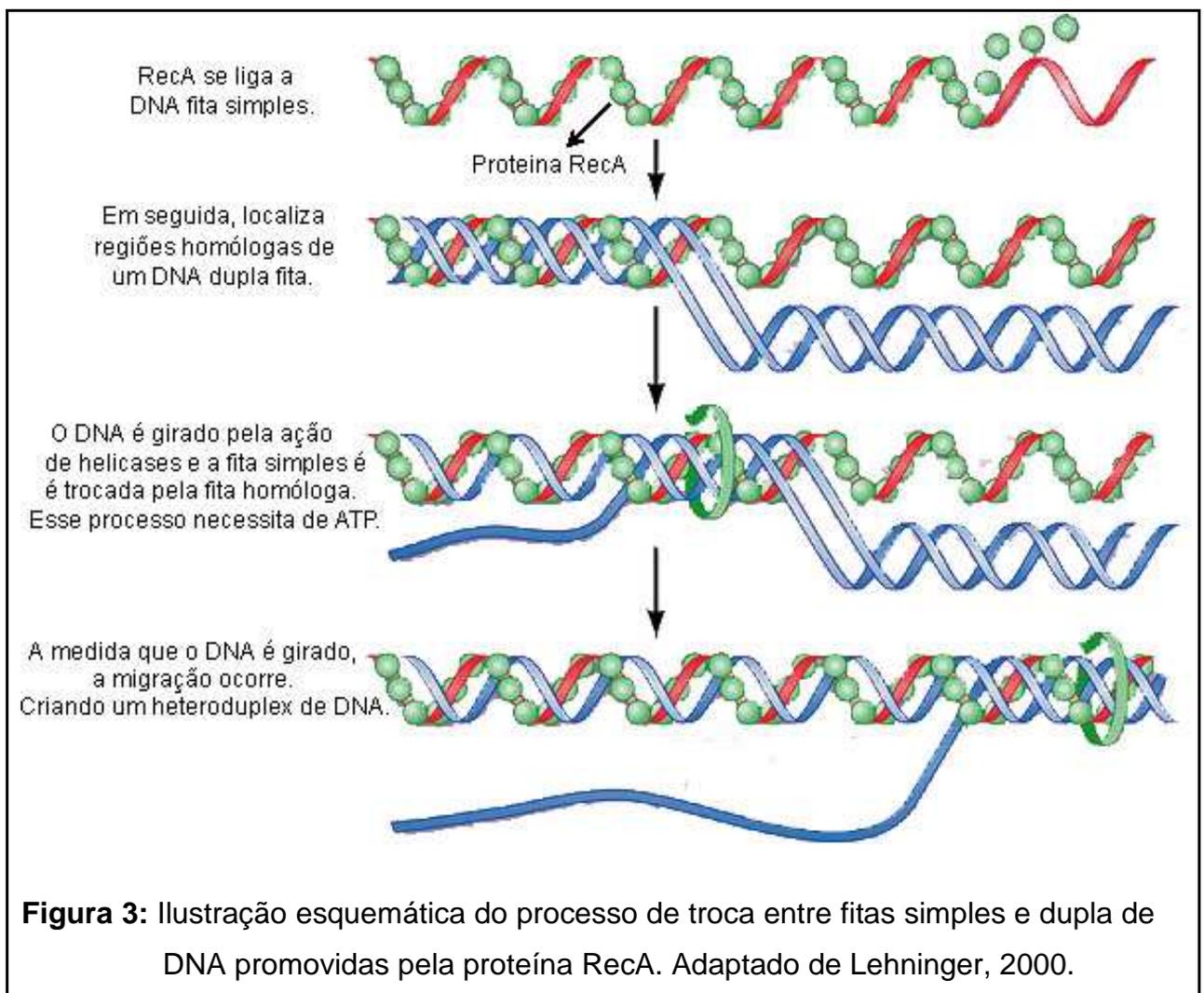


Figura 2: Ilustração esquemática do processo de recombinação e reparo de quebra de dupla fita. Adaptado de Lehninger, 2000.

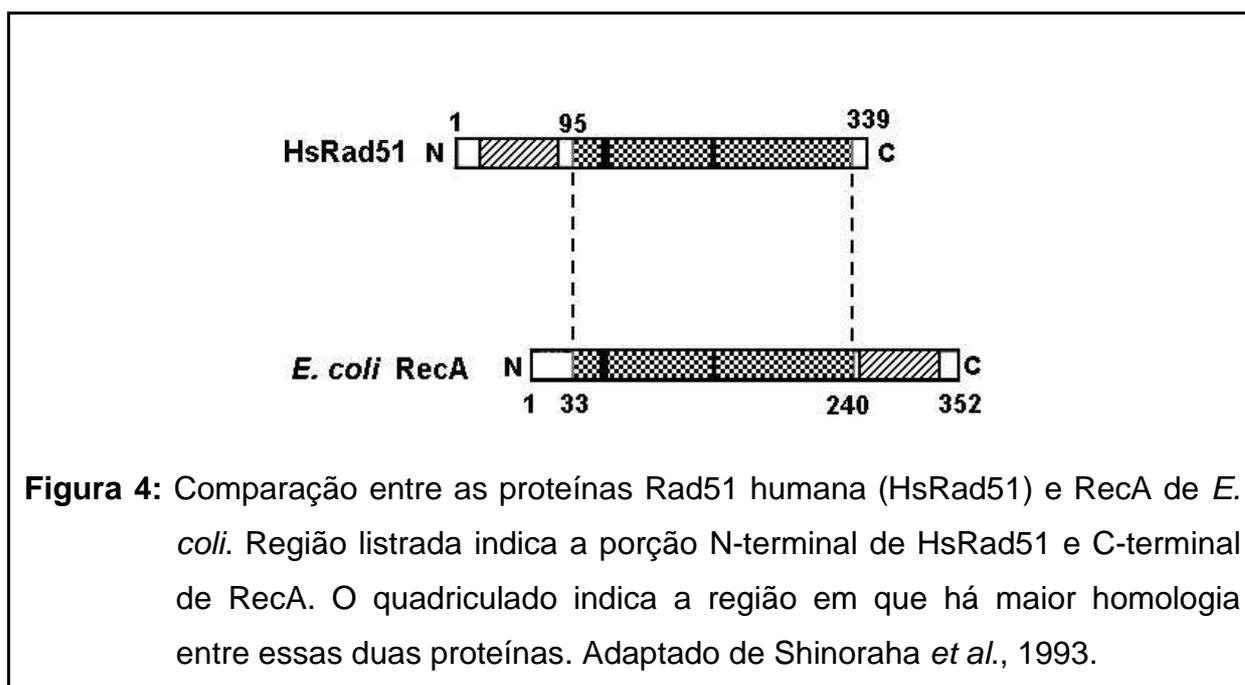
A proteína central nesse processo é a Rad51. Ela tem homologia com a proteína RecA de *E. coli* (Ivanov & Haber, 1997). Essas proteínas são capazes de se polimerizar sobre o DNA de fita simples formando um filamento de nucleoproteínas (Figura 3) e buscar regiões homólogas no DNA (Kowalczykowsky *et al.*, 1994). As proteínas Rad55 e Rad57 formam um heterodímero que estimula a reação de troca entre as fitas, ou seja, a invasão da fita simples na dupla fita (Sung, 1997). Além disso, a Rad55 é um ponto de regulação, relacionando essa via como o processo de “checkpoints”. Essa proteína é fosforilada em função da presença de danos no DNA e poderia estar influenciando o balanço entre diferentes vias de reparo que competem

entre si (Bashkirov *et al.*, 2000). Rad52 além de promover o anelamento entre duas fitas de DNA simples (Mortensen *et al.*, 1996), pode também realizar a troca de RP-A ligada à fita simples por Rad51 (New *et al.*, 1998). A proteína Rad59 também se liga à fita simples de DNA e poderia estar auxiliando Rad52 em sua função (Davis *et al.*, 2001). Rad54 interage com o filamento de nucleoproteína formado por Rad51 e o DNA simples fita para estimular o pareamento com a dupla fita homóloga. A atividade de ATPase de Rad54 também é necessária para a extensão da fita de DNA formada pela troca de fitas mediada por Rad51 (Solinger *et al.*, 2001).



1.4. As proteínas Rad51 e RecA

O processo de recombinação tem como passo central a troca entre as fitas de DNA em regiões homólogas. As proteínas capazes de realizar as reações enzimáticas necessárias para a execução desse passo são conhecidas como recombinases. Rad51, em eucariotos, e RecA, em procarionotos, são exemplos de proteínas que possuem essa capacidade. Essas duas enzimas guardam homologia estrutural e funcional. Essas proteínas promovem a busca por regiões homólogas do DNA, a invasão da fita simples na dupla fita homóloga (Figura 3) e a hidrólise do ATP para compor, assim, a reação total em que ocorre a troca entre fitas de DNA. Rad51 e RecA possuem regiões de ligação ao DNA e um domínio de ligação ao ATP, sendo esse último a região em que reside a maior parte da homologia estrutural quando se alinha a proteína RecA de *E. coli* e Rad51 de humanos (Shinoraha *et al.*, 1993). Em Rad51, essa região corresponde a C-terminal, ao passo que, em RecA, corresponde a N-terminal (Figura 4). Rad51 possui uma região extra N-terminal, ao passo que RecA possui uma região C-terminal extra. Estas regiões compreendem o domínio de ligação ao DNA (Aihara *et al.*, 1997; Kurumizaka *et al.*, 1996).



Camundongos em que o gene *Rad51* foi nocauteado apresentam falhas no desenvolvimento embrionário (Lim & Hasty, 1996; Tsuzuki *et al.*, 1996). Além disso, células de galinha em que esse gene está sob controle de um promotor induzido apresentam quebras nos cromossomos, paradas no ciclo celular e morte celular quando não há expressão de *Rad51* (Sonoda *et al.*, 1998). Em *Saccharomyces cerevisiae*, mutações nesse gene geram um fenótipo de sensibilidade a “crosslinks” entre fitas (Grossmann *et al.*, 2001). Além disso, células tumorais em humanos apresentam um elevado nível de expressão do gene *Rad51*, esse fenômeno pode estar conferindo resistência à radiação e aos agentes químicos utilizados na terapia (Raderschall *et al.*, 2002). Tais observações indicam que, em eucariotos, o gene *Rad51* participa de mecanismos importantes de manutenção genômica, principalmente quando as células se encontram em proliferação.

1.5. Replicação e recombinação

Durante o processo de replicação do DNA, um cromossomo é duplicado sendo que os dois cromossomos gerados são idênticos. Por outro lado, no processo de recombinação, ocorrem trocas genéticas gerando novas combinações de alelos independentes (Kuzminov, 2001a). Entretanto, há uma interdependência entre esses dois processos aparentemente opostos. Quando a forquilha de replicação do DNA para diante de uma lesão que escapou a todas as vias proficientes para repará-la (Kuzminov, 2001b), o processo de recombinação pode ser a última alternativa para corrigir tal lesão e permitir a continuação da replicação. Portanto o reparo por recombinação pode ser visto como mais uma função do processo de recombinação, assim as proteínas inicialmente identificadas como pertencentes ao grupo epistático Rad52 têm função nesse processo além de outras funções relevantes para a biologia da célula.

1.6. O *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário da classe mastigophora, ordem kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Esse parasito apresenta, em seu ciclo de vida, dois hospedeiros distintos, sendo um, insetos Reduviídeos hematófagos da família Triatominae e, o outro, diferentes mamíferos incluindo o homem em quem provoca a doença de Chagas. Três variações morfológicas desse parasito podem ser

observadas durante o seu ciclo de vida: epimastigota e tripomastigotas que são formas flageladas e amastigota que é a forma contendo somente um flagelo residual.

A forma tripomastigota é encontrada no sangue periférico de hospedeiros vertebrados e no trato digestivo do hospedeiro invertebrado. O inseto adquire a forma tripomastigota ao sugar o sangue de hospedeiro vertebrado infectado. O parasito se diferencia na forma epimastigota no intestino do inseto e se multiplica por divisão binária. Na ampola retal, o *T. cruzi* se diferencia na forma tripomastigota metacíclica que é a forma infectante do hospedeiro vertebrado. Ao picar um novo vertebrado, o inseto defeca, deixando fezes contaminadas com a forma infectante em contato com a pele. Os tripomastigotas metacíclicos alcançam a corrente sanguínea por meio de feridas, da própria abertura provocada pela picada ou por meio de mucosas. Essas formas infectam células de diversos tecidos se diferenciando na forma amastigota que se reproduz por divisão binária até o rompimento das células e liberação dos parasitos. Ocorre a diferenciação das formas amastigotas em tripomastigotas que podem infectar novas células ou infectar os hospedeiros invertebrados, completando assim o ciclo de vida do *T. cruzi* (revisado em Perreira, 1990).

A infecção do homem pelo *T. cruzi* se caracteriza por apresentar três estágios distintos. Inicialmente, é observada uma alta parasitemia culminado com a disseminação do protozoário em diversos tecidos. Durante a fase aguda, ocorre febre moderada a severa e, ocasionalmente, essa fase é fatal em crianças. A maioria dos pacientes chagásicos é assintomática sendo denominado de estágio indeterminado. Em um terceiro estágio, denominado de crônico, observa-se o aumento do volume do coração (cardiomegalia) e/ou aumento de órgãos gastrointestinais como o cólon e esôfago (megaesôfago e megacólon).

A principal área endêmica do mundo é a América Latina como cerca de 16 a 18 milhões de pessoas afetadas (WHO, 1991). Havia no Brasil cerca de cinco milhões de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* (Dias, 1992). Estimava-se que a população brasileira exposta ao risco de infecção era da ordem de 60 milhões (Silveira & Rezende, 1994), Mas atualmente, com a adoção de medidas de controle da população de vetor, o país encontra-se em uma situação onde novos casos de contaminação por transmissão vetorial foram reduzidos a níveis muito baixos (<http://www.who.int/tdr/publications/tdrnews/news62/chagas.htm>, janeiro de 2002).

Em outros países como a Argentina e Bolívia havia 7% e 22 % da população infectada por *T. cruzi*, respectivamente (Akhavan, 1996). Além da América Latina, nos E.U.A. existiam entre 100.000 e 370.000 pessoas infectadas apresentando uma doença crônica cardíaca (Skolnick, 1989, Milei et al., 1992). A doença de Chagas é um grave problema social por se tratar de enfermidade crônica debilitante, representando entre as patologias tropicais aquela que gera o maior ônus econômico segundo o Banco Mundial (Schmuñiz, 2000).

1.7. O Reparo de DNA em *T. cruzi*

Pesquisas em bancos de dados de seqüências gênicas (GenBank-Entrez) e na literatura (Pubmed-NCBI) revelam que há poucos estudos realizados com genes de reparo de DNA em *T. cruzi*. Foram isolados e caracterizados funcionalmente produtos de apenas três genes. Um deles foi isolado a partir de biblioteca da cepa Y e além de apresentar a atividade de Uracil DNA glicosilase (UDGase), constatou-se ainda que essa atividade pode ser estimulada por AP endonucleases (Farez-Vidal *et al.*, 2001). A UDGase é uma enzima do reparo por excisão de base especializada na remoção de uracilas provenientes da incorporação incorreta da uridina trifosfato durante o processo de síntese ou originadas da desaminação da citosina. Um outro gene também foi isolado a partir de biblioteca da cepa Y. O produto desse gene se mostrou capaz de reparar sítios Apirimidínicos/Apurínicos (AP) em *E. coli* (Perez *et al.*, 1999), sendo caracterizado como uma AP endonuclease. Essas enzimas retiram sítios AP originados pela hidrólise espontânea, causados por agentes alquilantes ou que surgem como produtos secundários de uma base hidrolisada por DNA n-glicosilases. O terceiro gene de reparo também foi isolado a partir de uma biblioteca. Ele tem homologia com o gene *MutS* de bactérias e é chamado de *TcMSH2* (Augusto-Pinto *et al.*, 2001). Esse gene tem uma janela aberta de leitura de 2889pb e codifica uma proteína de 962 aminoácidos. Análises computacionais indicam que esse gene tem também homologia com genes *MSH2* de outros eucariotos. Além disso, o seu produto protéico tem todos os domínios característicos de uma proteína *MSH2* típica. O gene *TcMSH2* apresenta-se com uma única cópia no genoma do parasito, sendo expresso em todas as formas durante o ciclo de vida desse organismo. O produto desse gene mostrou um efeito de dominância negativa em *E. coli*. A expressão desse gene em bactérias provoca o aumento da taxa de mutação. Isso ocorre uma vez que a proteína *TcMSH2* interfere no sistema de reparo de erro

de pareamento da bactéria. Esse fenótipo também foi observado para proteínas MSH2 de outros eucariotos.

1.8. O processo de recombinação em *T. cruzi*

Os mecanismos do processo de recombinação em *T. cruzi* são pouco entendidos, e também não se conhece as enzimas envolvidas. Entretanto, esse processo pode ser de grande relevância para o entendimento da biologia desse parasito. A estrutura populacional do *T. cruzi* é predominantemente clonal. Na ausência de reprodução sexuada, esperava-se que houvesse um alto grau de heterozigosidade devido a um alto nível de divergência entre os dois alelos (Birky, 1996). Em *T. cruzi*, verifica-se, ao contrário, uma baixa divergência entre dois alelos (Machado & Ayala, 2001). Este fato pode ser explicado por eventos de automixia, por conversões gênicas ou por eventos de recombinação mitótica. Assim, o estudo do gene *Rad51* se torna extremamente interessante não só pela participação de seu produto no reparo de quebra de dupla fita, mas também no processo de recombinação e geração de variabilidade genética do *T. cruzi*.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Clonar e caracterizar o gene *Rad51* de *Trypanosoma cruzi* (*TcRad51*).

2.2. Objetivos específicos

1. Amplificação por PCR e clonagem do fragmento contendo o gene *TcRad51*;
2. Obtenção da seqüência do gene;
3. Análise da organização do gene *TcRad51* no genoma do *T. cruzi*;
4. Análise da expressão do gene durante o ciclo de vida do parasito;
5. Caracterização da atividade funcional do produto desse gene em *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*;
6. Análises filogenéticas baseadas na seqüência do gene *TcRad51*.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Meio de cultura e linhagens de bactérias

Nos experimentos com bactérias, foi utilizado o seguinte meio:

Meio 2xYT

Bacto triptona	1,6 g
Extrato de levedura	1,0 g
NaCl	0,5 g
Água destilada	qsp 100 mL

O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH (1 N) e o meio esterilizado por autoclavação. Para produção do meio sólido, foi adicionado ágar (concentração final de 1,5%) antes da autoclavação.

As linhagens de bactérias utilizadas nesse trabalho são descritas na tabela I.

Tabela I: Características genotípicas das cepas de *E. coli* AB1157 e DH5- α .

Cepa	Características genotípicas	Referência
AB1157	<i>thr1, leu6, proA2, his4, argE3, thi1, lacY1, galk2, ara14, xyl5, mtl1, tsc33, rpsL31, supE44</i>	Bachman, 1972
DH5- α	<i>supE44 lacU169 (ϕ80/lacZ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1</i>	Hanahan, 1983

3.2. Meios de cultura e cepa de levedura

Nos experimentos com leveduras, foram utilizados os seguintes meios:

Meio YPD

Bacto triptona	2,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
Água destilada	qsp 90 mL

O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH (1 N) e o meio esterilizado por autoclavação. Após autoclavação, foi adicionado 10 mL de glicose 20%, esterilizada por filtração (filtro Millipore 0,22 μ m). Para produção do meio sólido, foi adicionado ágar (concentração final de 1,5%) antes da autoclavação.

Meio SD

Base nitrogenada de levedura (YNB)	0,17 g
Sulfato de amônio	0,5 g
Água destilada	qsp 90 mL

O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH (1 N) e o meio esterilizado por autoclavação. Após autoclavação, foi adicionado 10 mL de glicose 20%, esterilizada por filtração (filtro Millipore 0,22 μ m). Para produção do meio sólido, foi adicionado ágar (concentração final de 1,5%) antes da autoclavação. Os seguintes aminoácidos e nucleotídeos foram adicionados quando necessário: L-Histidina HCl mono hidratado 0,02%, L-Metionina 0,02%, L-Leucina 0,1%, L-Triptofano 0,02%, L-Adenina hemissulfato 0,02% e L-Uracila 0,02%.

A cepa de levedura utilizada nesse trabalho foi BY4735 (*MAT α* , *ade2 Δ ::hisG*, *his3 Δ 200*, *leu2 Δ 0*, *met15 Δ 0*, *trp1 Δ 63*, *ura3 Δ 0*; Brachman *et al.*, 1998).

3.3. Amplificação de DNA de *T. cruzi* por PCR

Foram feitas PCRs utilizando os iniciadores descritos na tabela II. Nas amplificações, foram usados dois nanogramas de DNA da cepa Tulahuén de *T. cruzi*, 10 pmol de cada iniciador, tampão IB 1x (Phoneutria, MgCl₂ 1,5 mM; KCl 50

mM; Triton X-100 0,1%; TrisHCl 10 mM pH 8,4), dNTPs 50 μ M, 2,5 unidades de Taq polimerase (Phoneutria) em um volume final de 50 μ L. Foi adicionado 20 μ L de óleo mineral. A reação foi realizada em um termociclador J.M. Research PTC-100 através do seguinte programa de amplificação:

- (i) 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C;
- (ii) 30 ciclos de desnaturação (95°C por 1 minuto), anelamento (55°C por 1 minuto) e extensão (72°C por 1 minuto);
- (iii) nova desnaturação, anelamento e uma extensão final de 10 minutos.
- (iv) 4°C indefinidamente.

Tabela II: Iniciadores TcRad51.10 e TcRad51.21 utilizados para amplificação do gene *TcRad51* por PCR.

Iniciador	Seqüência 5' - 3'
TcRad51.10	ATG AAC ACC CGC TCC AAG AG
TcRad51.21	CAA TCC CTT GCA TCC CCA AC

Os fragmentos amplificados foram clonado em pGEM-Teasy utilizando o “kit” pGEM-T Easy Vector System (Promega), segundo as normas descritas pelo fabricante. Foram transformados 2 μ L do produto da ligação em bactérias competentes DH5- α . Os clones foram selecionados por PCR de colônia e, em seguida, seqüenciados.

3.4. Transformação de *E. coli* competentes

As linhagens de *E. coli* DH5- α e AB1157 foram tornadas competentes para transformação com plasmídeos pelo método do cloreto de cálcio (Sambrook *et al.*, 1989). Cerca de 200 μ L (1×10^9 células/ μ g de DNA transformante) da célula competente de interesse, estocada a -70°C, foi incubada em banho de gelo por 30 min na presença de 2 μ L da reação de ligação ou 1 μ L (10 ng/ μ L) do plasmídeo

pUC18 sem inserto para controle positivo da transformação. Em seguida, as células foram submetidas ao choque térmico por 90 seg a 42°C, após este tratamento, foram adicionados 800 µL de meio 2xYT seguido de incubação por 1 h a 37°C sob agitação. Foram plaqueadas 200 µL de célula em meio sólido 2xYT ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina, IPTG e X-gal e incubadas à 37°C por 16 h.

3.5. PCR de colônias de bactérias transformadas

As colônias brancas de *E. coli* contendo os plasmídeos recombinantes foram submetidas a uma amplificação pela PCR com os iniciadores utilizados na clonagem. As colônias são tocadas com um palito de madeira estéril sendo, logo após, introduzido rapidamente dentro de um tubo para microcentrifuga de 200 µl contendo um volume de 10 µl da reação de PCR: tampão IB 1x (Phoneutria), dNTPs 50 µM, 5 pmol de cada iniciador ; 0,5 unidade de Taq DNA Polimerase (Phoneutria) e 20 µL de óleo mineral. A PCR foi realizada em um termociclador J.M. Research PTC-100 através do programa de amplificação descrito a seguir:

- (i) 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C;
- (ii) 25 ciclos de desnaturação (95°C por 1 minuto), anelamento (55°C por 1 minuto) e extensão (72°C por 1 minuto);
- (iii) nova desnaturação, anelamento e uma extensão final de 10 minutos.
- (iv) 4°C indefinidamente.

O produto da amplificação foi verificado através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. As colônias que apresentaram bandas do tamanho esperado para o gene *Rad51* de *T. cruzi* (cerca de 1100 pb) foram crescidas em 3 mL de meio líquido 2xYT contendo 200 µg/ml de ampicilina durante 16 horas sobre agitação de 180 rpm para posterior extração de plasmídeos.

3.6. Extração de plasmídeos pela técnica de “minipep”

O meio de cultura saturado com as bactérias DH5-α contendo os plasmídeos recombinantes foi centrifugado em micro-centrifuga “ependorf” à temperatura ambiente a uma rotação de 10000 xg durante 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante secando completamente o tubo com papel de filtro estéril para

submeter à amostra a extração dos plasmídeos recombinantes com o “kit” Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega). Após a extração, segundo as normas descritas pelo fabricante, a concentração do o plasmídeo recombinante foi estimada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

3.7. Reações de seqüenciamento

Todos os clones e subclones de cDNAs utilizados neste trabalho foram seqüenciados em ambas as direções usando o método descrito por Sanger (1977) e o seqüenciador automático capilar MegaBACE 1000 (Amersham Pharmacia Biotech). As reações de seqüenciamento foram feitas com o “kit” DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, segundo as normas do fabricante (Amersham Pharmacia Biotech), utilizando-se entre 300 a 400 ng do DNA de interesse e 5 pmol de iniciador M13 “universal” ou “reverse”. As reações foram feitas no termociclador Mastercycle gradient (Eppendorf), usando o seguinte programa:

- (i) 30 ciclos de desnaturação (95°C por 20 segundos), anelamento (50°C por 15 segundos) e extensão (60°C por 1 minuto);
- (ii) nova desnaturação, anelamento e uma extensão final de 10 minutos;
- (iii) 4°C indefinidamente.

Após as reações, os produtos fluorescentes eram submetidos ao protocolo de precipitação com etanol e injetados no seqüenciador de acordo com os protocolos recomendados pelo fabricante (Amersham Pharmacia Biotech).

3.8. Extração de DNA genômico de epimastigotas de *T. cruzi*

O DNA genômico de epimastigotas das cepas Tulahuén e CL-Brener foi extraído baseando-se nos procedimentos descritos por Teixeira *et al.* (1994) com algumas modificações. Aproximadamente 1×10^9 parasitas mantidos em meio de cultura em fase exponencial de crescimento foram coletados por centrifugação a 1.500 xg por 10 min a 4°C, sendo o sedimento solubilizado em PBS e novamente centrifugado a 1.500 xg por 10 min a 4°C. Este passo foi repetido mais uma vez. As células foram solubilizadas no tampão de lise/digestão (NaCl 100 mM; Tris-HCl

10 mM pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0; SDS 0,5%; proteinase K 100 pg/mL; RNAase 70 µg/mL) e incubadas em banho-maria a 50°C por 3 h com leves homogeneizações periódicas. Após o tratamento o lisado foi resfriado à temperatura ambiente e, em seguida, foram feitas duas extrações com igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) através de leves homogeneizações durante 10 min. As fases aquosa e orgânica foram separadas por centrifugação a 16.000 xg por 10 min, sendo que a fase aquosa foi transferida para outro tubo e o DNA precipitado com 2 vezes volume com etanol absoluto e NaCl 0,2 mM (concentração final). O DNA foi sedimentado por centrifugação a 16.000 xg por 15 min a 4°C, o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70% (p/v), secado e solubilizado com 100 µL de TE. A integridade do DNA obtido e sua quantificação foram avaliadas através de eletroforese em géis de agarose 1%.

3.9. "Southern blot"

DNAs de *T. cruzi*, extraídos da forma epimastigota, foram digeridos com diferentes enzimas de restrição (*NcoI*, *BamHI*, *EcoRI*) de acordo com as instruções do fabricante (New England Biolabs). Após a digestão, o DNA foi resolvido em gel de agarose 0,8% durante 6 h a 40 V. Após eletroforese, o gel foi tratado por 15 min com solução de depurinação (HCl 0,25 M), transferido para solução de desnaturação (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) por 2 vezes durante 30 min e, em seguida, incubado em solução de neutralização (Tris-HCl 0,5 M pH 7,0, NaCl 3 M) por 2 vezes de 30 min (Sambrook *et al.*, 1989). Esses tratamentos foram conduzidos a temperatura ambiente e sob agitação lenta. O DNA foi transferido para membrana de "nylon" Hybond-N (Amershan) por meio de capilaridade em solução SSC 10X (NaCl 1,5 M e citrato de sódio 0,15 M, pH 7,0) por 24 h (Sambrook *et al.*, 1989).

Após a transferência, a membrana foi lavada em SSC 2X e o DNA imobilizado com luz ultravioleta utilizando-se o aparelho UVStratalinker (Stratagene) de acordo com instruções do fabricante. A membrana foi pré-hibridizada em 40mL de solução de hibridização (formamida 50% (v/v); SSC 6X; Denhardtts 10X; SDS 0,2%; DNA de esperma de salmão (ssDNA) 75 µg/mL) a 42°C por 2 h. A hibridização foi conduzida por 24 h em 20 mL de solução hibridização contendo sonda para o gene *TcRad51*, previamente desnaturada a 10°C durante 5 min. Em seguida, procederam-se duas lavagens da membrana em solução de SSC 2X e SDS 0,1% a 65°C. Após a

lavagem, a membrana foi selada e exposta em filme de raios X a -70°C em cassete. A revelação foi feita após diferentes tempos de exposição.

3.10. Extração de RNA total de *T. cruzi*

RNA total das três formas do *T. cruzi* (epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas, obtidos a partir de cerca de 1×10^9 células cada) foram gentilmente cedidos pela aluna de doutorado Daniella C. Bartholomeu (Departamento de Bioquímica e Imunologia) e mantidas a -70°C . Estas amostras foram preparadas utilizando-se o "kit" RNAeasy Mini Kit (Qiagen) de acordo com as indicações do fabricante. O método de extração consiste em lise na presença de isotiocianato de guanidina e cromatografia de afinidade, onde RNAs maiores que 200 pb ligam seletivamente a membrana de sílica-gel. Após a extração, o material foi utilizado para realização do "Northern blot".

3.11. "Northern blot"

Os géis de agarose para análise das amostras de RNA foram realizados na concentração 1% em tampão MOPS 1X/EDTA (MOPS 0,02 M; Acetato de sódio 5 mM; EDTA 1 mM, pH 7,0) e formaldeído 2% (Sambrook *et al.*, 1989). Foram adicionados 25 μL de tampão de amostra (0,75 mL de Formamida deionizada; 0,15 mL de tampão MOPS 10X; 0,24 mL de Formaldeído; 0,1 mL de Água; 0,1 mL de Glicerol; 0,08 mL de Azul de Bromofenol a 10% (p/v)) em 5 μL de amostra e incubado a 65°C por 15 min. Em seguida, 1 μL de brometo de etídeo 1,0 mg/mL foi adicionado às amostras e estas aplicadas no gel. Após a corrida, o gel foi analisado em transluminador de UV. O gel que foi utilizado na transferência foi tratado inicialmente com solução NaOH 50 mM por 20 min, e em SSC 20X por 40 min. Os RNAs foram transferidos para membrana Hybond-N (AMERSHAM) por capilaridade em solução SSC 10X. A pré-hibridização, hibridização, lavagens e exposição das membranas foram realizadas conforme descrito para o "Southern blot".

3.12. Marcação de sondas com ^{32}P e purificação da sonda radioativa

A sonda utilizada para o “Southern blot” e “Northern blot” desse trabalho foi construída a partir da amplificação pela PCR do cDNA completo de *TcRad51* clonado em pUC18. A reação foi realizada em um volume de 50 μL contendo os seguintes reagentes: 10 pmol de cada iniciador, tampão IB 1x (Phoentria), dNTPs 50 μM , 2,5 unidades de Taq polimerase (Phoentria). Foram adicionados 20 μL de óleo mineral. A PCR foi feita em um termociclador J.M. Research PTC-100 através do programa de amplificação descrito a seguir:

- (i) 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C;
- (ii) 35 ciclos de desnaturação (95°C por 1 minuto), anelamento (55°C por 1 minuto) e extensão (72°C por 1 minuto);
- (iii) nova desnaturação, anelamento e uma extensão final de 10 minutos
- (iv) 4°C indefinidamente.

O produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Em seguida, a banda do gel correspondente ao fragmento de interesse foi cortada e purificada com o “kit” Wizard PCR Preps Purification System (Promega) segundo norma do fabricante.

Após a estimativa da concentração de DNA feita em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, 100 ng de fragmento de DNA purificado foi adicionado a reação de marcação de acordo com as indicações do fabricante do “kit” Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim Biochemica), utilizando-se 50 μCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP por reação. Após 30 min de marcação a 37°C, as reações eram bloqueada com 2 μL de EDTA 0,2 M pH 8,0. Foi utilizado sistema de gel de filtração molecular para eliminação de nucleotídeos não incorporados. A coluna utilizada foi a Nick Columns (Pharmacia). O nível de radiação das frações verificados em Geiger (Mini Monitor Scintillation Probes-Series 900), sendo que a segunda fração correspondente aos nucleotídeos incorporados foi guardada e, posteriormente, fervida e adicionada à solução de hibridização.

3.13. Ensaio de mutagênese em *E. coli*

Neste ensaio, foram utilizadas as cepas AB1157 e DH5- α de *E. coli*. Na tabela I, estão descritas as características fenotípicas dessas cepas. Ambas são sensíveis aos antibióticos ampicilina e rifampicina. Entretanto, é possível estabelecer um fenótipo de resistência a ampicilina quando as células são transformadas com o vetor pUC18 que contém o gene de resistência a este antibiótico.

Amostras de células competentes destas cepas foram transformadas com pUC18 contendo ou não insertos de cDNAs do gene *Rad51* de *T. cruzi*. As células transformadas foram mantidas em placa de cultura contendo 2xYT ágar com 100 mg/ml de ampicilina por no máximo 7 dias. Para o ensaio as células eram coletadas com um palito de madeira estéril e transferidas para tubos de ensaio contendo 2 mL de meio 2xYT e 2 μ L de ampicilina (100 mg/ml) e submetidas ao crescimento por 16 h a 37°C no agitador. Após o crescimento, as células contendo cDNAs de Rad51 eram centrifugadas a 3000 xg por 10 min. Sendo solubilizadas em 250 μ L de 2xYT. Após isso as células eram diluídas 10^6 vezes e 100 μ L eram plaqueados em 2xYT ágar com 100 mg/mL de ampicilina. E 100 μ L das células não diluídas eram plaqueadas em 2xYT ágar com 100 mg/mL de ampicilina e 50 mg/mL de rifampicina diluída em metanol. Finalmente, era calculada a taxa de mutação usando $r_0 = M (1,24 + \ln M)$, onde r_0 é o número médio de mutações que conferem resistência a rifampicina em um número de culturas independentes (13 experimentos) e o M é o número médio de mutações por cultura. O valor de M é resolvido por interpolação utilizando o valor de r_0 conhecido e utilizado, então, para calcular a taxa de mutação r , onde $r = M/N$ e N é o número final de células viáveis (Lea & Coulson, 1949).

3.14. Transformação de *Saccharomyces cerevisiae*

O protocolo utilizado nas transformações de *Saccharomyces cerevisiae* foi descrito por Giestz *et al.*, 1996. Uma colônia da levedura foi inoculada em 5 mL de meio YPD para crescimento a 30°C por 16 h. Em seguida, foi feito um novo pré-inóculo em 5 mL utilizando 250 μ L do inóculo anterior para um novo crescimento a 30°C durante a noite (16 h). No dia seguinte, as células são contadas e inoculadas a

uma concentração de 5×10^6 células/mL em 20 mL e, então, colocadas para crescer a 30°C sob 250 rpm de agitação. Após alcançar a densidade entre $1,6$ e $2,0 \times 10^7$ células/mL, as células são distribuídas em tubos de 15 mL de acordo com o número de transformações que se deseja fazer. Em cada tubo é colocado um volume que contenha $1,0 \times 10^8$ células. É feita uma centrifugação por 10 min a 3000 xg. O sobrenadante é descartado, e as células são solubilizadas em água mili-Q estéril. É feita uma nova centrifugação. As células são solubilizadas em 600 µL acetato de lítio 0,1 M e transferidas para um tubo de 1,5 mL. São feitas uma nova centrifugação e uma nova lavagem com 400 µL acetato de lítio 0,1 M. O acetato de lítio é removido cuidadosamente com uma micropipeta e são adicionados em ordem 240 µL de PEG 50%, 36 µL acetato de lítio 1 M, 25 µL de DNA de esperma de salmão (DNA carreador) 2 mg/mL (previamente fervido e resfriado em banho de gelo) e 50 µL de solução contendo 1 µg do DNA de interesse. O conteúdo do tubo é vigorosamente misturado utilizando-se um vórtex até se tornar o mais homogêneo possível. É feita uma incubação a 30°C por 30 min e o choque térmico é realizado em banho-maria a 42°C por mais 30 min. Em seguida, é feita uma centrifugação a 13000 xg por 15 seg, o sobrenadante é removido com uma micropipeta. As células são gentilmente solubilizadas em 250µL água miliQ estéril. As células são plaqueadas em meio mínimo SD ágar complementado com nucleotídeos e aminoácidos adequados para seleção de células transformadas.

3.15. Construção de linhagem de *S. cerevisiae* nocaute para o gene *Rad51*

A tabela III contém as seqüências dos iniciadores utilizados na construção e seleção da linhagem de *S. cerevisiae* nocaute para o gene *Rad51*.

Os iniciadores rd51his310 e rd51his321 foram utilizados na amplificação pela PCR de um cassete para o gene *His3* de *S. cerevisiae*. Na amplificação, foi usado 1 ng do plasmídeo pDis gentilmente cedido por Dr. Francisco Nóbrega (UNIVAP, São Paulo), 10 pmol de cada iniciador, tampão IB 1x (Phoneutria), dNTPs 50 µM, 2,5 unidades de Taq polimerase (Phoneutria) em um volume final de 50 µL. Foram

adicionados 20 µl de óleo mineral. A PCR foi feita em um termociclador J.M. Research PTC-100 através do programa de amplificação descrito a seguir:

- (i) 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C;
- (ii) 35 ciclos de desnaturação (95°C por 1 minuto), anelamento (55°C por 1 minuto) e extensão (72°C por 1 minuto);
- (iii) nova desnaturação, anelamento e uma extensão final de 10 minutos;
- (iv) 4°C indefinidamente.

O produto de PCR correspondente ao cassete *His3* foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. O cassete de cerca de 1,2 kb foi purificado utilizando-se o “kit” Wizard PCR Preps Purification System (Promega) segundo normas do fabricante. Esse cassete foi utilizado na transformação de *S. cerevisiae* da cepa BY4735 segundo protocolo descrito acima. As células transformadas foram plaqueadas em meio mínimo SD ágar complementado com adenina, leucina, metionina, triptofano e uracila. Os transformantes foram selecionados pela sua capacidade de crescer em meio mínimo na ausência de histidina.

Tabela III: Iniciadores utilizados na construção e seleção de nocaute de *S. cerevisiae* nocaute para o gene *ScRad51*.

Inciadores	Seqüência 5´- 3´
rd51his310	ATG TCT CAA GTT CAA GAA CAA CAT ATA TCA GAG TCA CAG CCT TCA TTC AAC GTT TCC CAT
rd51his321	TAC CAC CAT CAA CTT GGG CGA CCA CTT GGT TAG TAA CGA CAG TAT CAT ACT GTT CGT ATA
Yrad5110	CTG TCC TGG TTT GTT TAC
Yrad5121	TAC GGA ACG CAA CCT AAG
HIS311	AAC CCT ATA CCT GTG TGG A

Para verificar se o cassete *his3* havia sido corretamente integrado foi feita uma PCR utilizando os iniciadores Yrad5110 e Yrad5121. Na amplificação, a colônia

era tocada com um palito e inserida em um tubo que continha em 50 μ L: 25 pmol de cada iniciador, tampão IB 1x (Phoneutria), dNTPs 50 μ M, 2,5 unidades de Taq polimerase (Phoneutria). Foram adicionados 20 μ L de óleo mineral. As colônias eram solubilizadas vigorosamente utilizando-se um vórtex. A PCR foi feita em um termociclador J.M. Research PTC-100 através do programa de amplificação descrito a seguir:

- (i) 10 minutos de desnaturação inicial a 95°C;
- (ii) 35 ciclos de desnaturação (95°C por 1,5 minutos), anelamento (55°C por 1,5 minutos) e extensão (72°C por 2,5 minutos);
- (iii) nova desnaturação, anelamento e uma extensão final de 10 minutos;
- (iv) 4°C indefinidamente.

Para análise, o produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. As colônias que apresentavam uma amplificação de cerca de 1,4 kb eram consideradas negativas, ou seja, o cassete havia sido inserido em outro local no genoma. Já as colônias que apresentavam uma amplificação de cerca de 1,7 kb eram consideradas positivas. Na ausência de amplificação, foi feita uma nova PCR utilizando os iniciadores Yrad5110 e HIS311 sob as mesmas condições descritas acima. Novamente, o produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para análise. Eram consideradas positivas as colônias em que havia a amplificação de um fragmento de cerca de 800 pb.

3.16. Atividade funcional do gene *TcRad51* em *S. cerevisiae*

O gene *TcRad51* foi amplificado pela PCR utilizando o protocolo descrito no **item 3.2**. Dessa vez, a amplificação foi feita a partir de 2 ng do gene já clonado em pUC18 ao invés de DNA genômico. O produto da PCR foi purificado utilizando o “kit” Wizard PCR Preps Purification System (Promega) e em seguida clonado no vetor pYeDP (vide **Anexos**) utilizando o sistema SureClone Ligation Kit (Pharmacia Biotech). A clonagem foi feita segundo normas do fabricante exceto pelo fato do vetor pUC18 (vide **Anexos**) ter sido substituído pelo plasmídeo pYeDP digerido com a enzima *Sma*I. O gene também foi clonado em pUC18 como controle da ligação. Foi feita transformação da cepa DH5- α de *E. coli*, e, em seguida, PCR das colônias

brancas e purificação dos plasmídeos como já descrito. Foi feita uma digestão com *EcoRI* (Gibco-BRL) para verificar quais vetores possuíam o gene *TcRad51* em fase.

As leveduras *S. cerevisiae* nocaute para *Rad51* ($\Delta rad51::HIS3$) foram transformadas (segundo **item 3.13**) com o plasmídeo pYeDP contendo ou não o gene *TcRad51*. As células transformadas foram plaqueadas em meio mínimo SD ágar contendo leucina, metionina, triptofano e uracila. Os transformantes foram selecionados pela sua capacidade de crescer em meio mínimo na ausência de adenina. Para confirmar os transformantes com o plasmídeo contendo o gene *TcRad51* foi feita uma PCR de colônia utilizando os iniciadores TcRad51.10 e TcRad51.21. A PCR foi feita como descrita no **item 3.14** exceto pelos iniciadores.

Para análise funcional, as leveduras $\Delta rad51::HIS3$ transformadas com os plasmídeos pYeDP contendo ou não o gene *TcRad51* foram colocadas para crescer em meio mínimo SD líquido complementado com leucina, metionina, triptofano e uracila a 30°C por 16 h. As células foram contadas e inoculadas a uma concentração de 5×10^6 células/mL em 20 mL desse mesmo meio, então, colocadas para crescer a 30°C sob 250 rpm de agitação. Após atingir a densidade de $1,6 \times 10^7$ células/mL, as células foram diluídas em série para 10^6 , 10^5 e 10^4 células/mL. Em seguida, 5 μ L de cada diluição eram plaqueadas em meio SD ágar complementado com leucina, metionina, triptofano e uracila. Foram utilizadas duas placas, uma em que a fonte de carbono era glicose e outra, em que era galactose.

3.17. Análises filogenéticas do gene *TcRad51*

Para análise, foi obtida a seqüência de um fragmento de 359 pares de bases do gene *TcRad51* de dez cepas de *T. cruzi*: 1005, 115, 167, 239, Tulahuén, 231, 222, D7, Colombiana e RB1. Esse fragmento foi amplificado utilizando os iniciadores TcRad51.10 (Tabela I) e Tcr5131 (5' - GCG GAT GAA AAG CCC ATT - 3') pela PCR. Foi feita uma reação de 50 μ L que continha: 10 pmol de cada iniciador, tampão IB 1x (Phoneutria), dNTPs 50 μ M, 2,5 unidades de Taq polimerase (Phoneutria). Foram adicionados 20 μ L de óleo mineral. Foram usado de 1 a 2 ng de DNA para cada cepa. A PCR foi feita em um termociclador J.M. Research PTC-100 através do programa de amplificação descrito a seguir:

- (v) 10 minutos de desnaturação inicial a 95°C;
- (vi) 35 ciclos de desnaturação (95°C por 1 minutos), anelamento (55°C por 1 minutos) e extensão (72°C por 1 minutos);
- (vii) nova desnaturação, anelamento e uma extensão final de 10 minutos;
- (viii) 4°C indefinidamente.

Para análise, o produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Em seguida, as amplicações foram submetidas a purificação utilizando o “kit” Wizard PCR Preps Purification System (Promega) segundo norma do fabricante. A clonagem dos fragmentos foi feita utilizando o “kit” pGEM-T Easy Vector System (Promega), também segundo normas do fabricante. O produto das ligações utilizando esse sistema de clonagem foi transformados em bactérias *E. coli* competentes, e a seleção da colônia com inserto desejado foi feita por PCR de colônia e a purificação dos plasmídeos foi feita utilizando a “miniprep”. Todas essas técnicas foram realizadas de acordo com descrito nos **itens 3.4, 3.5 e 3.6**. Os seqüenciamento foram feitos utilizando o seqüenciador MegaBace.

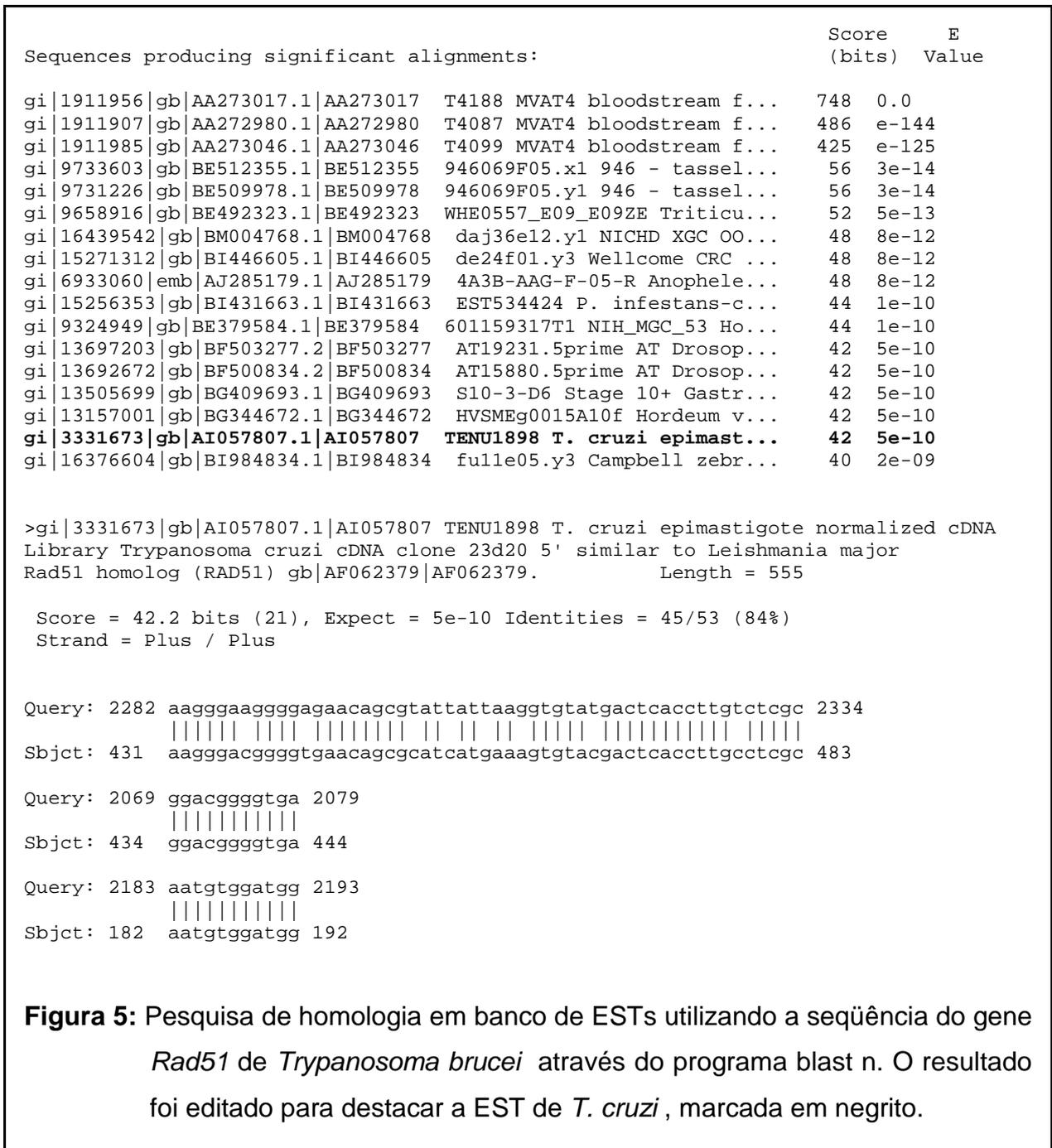
As seqüências obtidas para cada cepa foram utilizadas para construção de uma árvore filogenética utillizando um grupo de programas chamado Phylip versão 3.5 (Felsenstein, 1993; <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). O primeiro deles foi o seqboot para cálculo dos valores de “bootstrap”. Esse valor informa o número de vezes que a divergência de dois ramos da árvore aparecem para um determinado número de árvores. Em nossas, análises foram utilizadas 100 árvores como parâmetro. Em seguida, com base nesses valores, é criada uma matriz de distância entre as cepas utilizando o programa DNAdist. Essa matriz serve de parâmetros para a construção das 100 árvores utilizando o programa Neighbor. Para finalizar, é gerada uma árvore consenso utilizando-se o programa Consense.

RESULTADOS

4.1. Análises de ESTs homólogas ao gene *Rad51* de *T. brucei*

A seqüência do gene *Rad51* de *T. brucei* foi utilizada para fazer uma pesquisa no programa blast n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) que revelou uma única EST de *T. cruzi* (Figura 5). Essa EST, identificada pela ID AI057807, possui 84% de identidade em relação à seqüência de *T. brucei*. O tamanho total da EST é de 556 nucleotídeos sendo essa seqüência obtida de uma biblioteca de cDNA normalizada construída a partir de epimastigotas da cepa CL-Brener. A seqüência classificada como sendo de alta qualidade foi utilizada para fazer uma nova busca no programa blast n no banco de dados de ESTs (Figura 6). O resultado da pesquisa revelou a presença de três ESTs com homologia significativa sendo uma delas a própria EST AI057807 utilizada na pesquisa. Uma das ESTs apresenta 492 nucleotídeos e está identificada pela ID AI562578. A outra, ID AI667881, apresenta 762 nucleotídeos obtidos de uma seqüência de alta qualidade. Ambas também são provenientes de biblioteca de cDNA da cepa CL-Brener. Verificou-se que as seqüências correspondem a regiões diferentes do gene. A determinação da seqüência de aminoácidos codificada por cada uma das ESTs foi realizada utilizando o programa blast x. Os resultados revelaram que havia EST correspondentes as regiões 5' e 3' do gene *Rad51* de *T. cruzi*. Uma das janelas abertas de leitura da EST AI057807 possui homologia com a região N-terminal da proteína *Rad51* de *T. brucei* sendo que essa janela se inicia no nucleotídeo 53, que corresponde ao ATG inicial (Figura 7). Tal homologia se estende até o aminoácido 123. Essa mesma EST possui uma janela aberta de leitura homóloga à região C-terminal a partir da posição do nucleotídeo 395. As duas outras EST possuíam homologia apenas com a região C-terminal de *Rad51* de *T. brucei* (Figuras 8 e 9). A EST AI562578 possui uma janela aberta de leitura a partir do nucleotídeo 7. Os resíduos de aminoácidos dessa janela se alinham com os resíduos a partir da posição 225 de *Rad51* de *T. brucei*. Já a EST AI667881 possui uma janela aberta de leitura se iniciando na posição 8, sendo que a posição do resíduo de aminoácido 285 de *Rad51* de *T. brucei* representa o aminoácido a partir do qual ocorre o alinhamento. As EST obtidas não fornecem a seqüência completa do gene *Rad51* de *T. cruzi* como revelado pelos alinhamentos dos Blast x (Figura 10). Entretanto, como elas contêm tanto a região 5' quanto a 3' do gene, foi possível construir um par de iniciadores para amplificação da janela

aberta de leitura do gene *TcRad51*. Esses iniciadores foram identificados pelos nomes TcRad51.10 e TcRad51.21 (seqüência apresentada em **Material e Métodos**), sendo que o primeiro se anela com 18 nucleotídeos a partir do ATG inicial e o segundo, com 18 nucleotídeos a partir do código de terminação.



Sequences producing significant alignments:				Score	E
				(bits)	Value
gi 3331673 gb AI057807.1 AI057807	TENU1898	T. cruzi epimast...	1053	0.0	
gi 4513923 gb AI562578.1 AI562578	TENS2112	T. cruzi epimast...	246	4e-72	
gi 4826253 gb AI667881.1 AI667881	TENG0846	T. Cruzi epimast...	192	5e-56	
gi 9199615 gb BE325838.1 BE325838	NF084B12ST1F1094	Developi...	48	2e-12	
gi 11782798 gb BF612300.1 BF612300	daa17a11.y1	NICHD XGC Lu...	46	7e-12	
gi 15698495 gb BI722800.1 BI722800	1031064C05.y1	C. reinhar...	44	3e-11	
gi 15460833 gb BI569411.1 BI569411	RH01484.3prime	RH Drosop...	44	3e-11	

Figura 6: Pesquisa de homologia em banco de ESTs utilizando a seqüência da EST AI057807 através do programa blast n. Em negrito, ESTs de *T. cruzi*.

Sequences producing significant alignments:				Score	E
				(bits)	Value
gi 5802566 gb AAD51713.1 AF174136_1 (AF174136)	RAD51 [Trypa...	132	1e-30		
gi 3132709 gb AAC16334.1 (AF062379)	Rad51 homolog [Leishma...	123	8e-28		
gi 2108337 emb CAA73605.1 (Y13144)	Rad51 homologue [Trypan...	102	2e-21		
gi 395377 emb CAA80878.1 (Z24756)	RecA-like protein [Schiz...	96	2e-19		

>gi|5802566|gb|AAD51713.1|AF174136_1 (AF174136) RAD51 [Trypanosoma brucei]
Length = 373

Score = 132 bits (333), Expect = 1e-30
Identities = 74/123 (60%), Positives = 85/123 (68%), Gaps = 2/123 (1%)
Frame = +2

Query: 53 MNTRSKRGKR-KGVEEVEVHEIANTSPDPVAAPXXXXXXXXXXNV-DGANNGGFRVIQV 226
MNTR+K KR K V E EVH+I +T+ D A V D A FRV+Q+

Sbjct: 1 MNTRTKNKKRTKEVIEDEVHDIDDTAFDDAAVDAVNDNTQEMQQQVGDAAAGGPSFRVLQI 60

Query: 227 LESYGIASADIKKLMESGFYTVESVAYTPKKNILAVKGISETKADKIMAECAKLVPMGFT 406
+E+YG+ASADIKKLM E GF TVESVAY PKK+ILAVKGI SE KA+KIMAEC KL PMGFT

Sbjct: 61 MENYGVASADIKKLMCEGFLTVESVAYAPKKSILAVKGI SEAKAEKIMAECCKLTPMGFT 120

Query: 407 STT 415
T

Sbjct: 121 RAT 123

Score = 86.7 bits (213), Expect = 1e-16
Identities = 41/48 (85%), Positives = 44/48 (91%)
Frame = +2

Query: 395 MGFTSTTRLSLRKGRGEQRIMKVYDSPCLAEAEIIFGIYEDGVGDARD 538
M STTRLSLRKGRGEQRI+KVYDSPCLAE+EAIFGIYE+GVGD RD

Sbjct: 326 MAHASTTRLSLRKGRGEQRIIKVYDSPCLAESEIIFGIYENGVDVRD 373

Figura 7: Pesquisa de homologia utilizando a seqüência da EST AI057807 através do programa blast x. Em negrito, *Rad51* de *T. brucei*.

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(bits)	Value
gi 3132709 gb AAC16334.1	(AF062379) Rad51 homolog [Leishma...	134	3e-31
gi 9663716 emb CAC01068.1	(AL390935) probable DNA repair p...	130	4e-30
gi 2108337 emb CAA73605.1	(Y13144) Rad51 homologue [Trypan...	126	9e-29
gi 5802566 gb AAD51713.1 AF174136_1	(AF174136) RAD51 [Trypa...	126	9e-29
gi 2500103 sp P70099 RA51_CRIGR	DNA REPAIR PROTEIN RAD51 HO...	105	2e-22

Alignments

>gi|3132709|gb|AAC16334.1| (AF062379) Rad51 homolog [Leishmania major]
Length = 377

Score = 134 bits (338), Expect = 3e-31
Identities = 66/72 (91%), Positives = 69/72 (95%)
Frame = +1

Query: 64 VVANVDGSAQMFAXAKKPIGGHIMAHASTTRLSLRKGRGEQRIMKVYDSPCLAEAKAIF 243
VVANVDGSAQMF A +KKPIGGHIMAHASTTRLSLRKGRGEQRI+KVYDSPCLAEA+AIF
Sbjct: 306 VVANVDGSAQMFQADSKKPIGGHIMAHASTTRLSLRKGRGEQRIIKVYDSPCLAEAEAIIF 365

Query: 244 GIYXDGVDGARD 279
GIY DGVDGARD
Sbjct: 366 GIYDDGVDGARD 377

>gi|2108337|emb|CAA73605.1| (Y13144) Rad51 homologue [Trypanosoma brucei]
Length = 313

Score = 126 bits (316), Expect = 9e-29
Identities = 66/91 (72%), Positives = 75/91 (81%)
Frame = +1

Query: 7 LRPFRXEGNMAXLWSLQIFVVANVDGSAQMFAXAKKPIGGHIMAHASTTRLSLRKGRGE 186
LR E N+A + + Q VVANVDG+A F A +KKPIGGHIMAHASTTRLSLRKGRGE
Sbjct: 225 LRNLANEYNVAVVVTNQ--VVANVDGAAPTFQADSKKPIGGHIMAHASTTRLSLRKGRGE 282

Query: 187 QRIMKVYDSPCLAEAKAIFGIYXDGVDGARD 279
QRI+KVYDSPCLAE++AIFGIY +GVGD RD
Sbjct: 283 QRIIKVYDSPCLAESEAIIFGIYENGVDVDRD 313

>gi|5802566|gb|AAD51713.1|AF174136_1 (AF174136) RAD51 [Trypanosoma brucei]
Length = 373

Score = 126 bits (316), Expect = 9e-29
Identities = 66/91 (72%), Positives = 75/91 (81%)
Frame = +1

Query: 7 LRPFRXEGNMAXLWSLQIFVVANVDGSAQMFAXAKKPIGGHIMAHASTTRLSLRKGRGE 186
LR E N+A + + Q VVANVDG+A F A +KKPIGGHIMAHASTTRLSLRKGRGE
Sbjct: 285 LRNLANEYNVAVVVTNQ--VVANVDGAAPTFQADSKKPIGGHIMAHASTTRLSLRKGRGE 342

Query: 187 QRIMKVYDSPCLAEAKAIFGIYXDGVDGARD 279
QRI+KVYDSPCLAE++AIFGIY +GVGD RD
Sbjct: 343 QRIIKVYDSPCLAESEAIIFGIYENGVDVDRD 373

Figura 8: Pesquisa de homologia utilizando a seqüência da EST AI562578 através do programa blast x. Em negrito, *Rad51* de *T. brucei*.

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 3132709 gb AAC16334.1 (AF062379) Rad51 homolog [Leishma...	60	2e-08
gi 2108337 emb CAA73605.1 (Y13144) Rad51 homologue [Trypan...	57	2e-07
gi 5802566 gb AAD51713.1 AF174136_1 (AF174136) RAD51 [Trypa...	57	2e-07
gi 9663716 emb CAC01068.1 (AL390935) probable DNA repair p...	57	2e-07
gi 2500103 sp P70099 RA51_CRIGR DNA REPAIR PROTEIN RAD51 HO...	49	6e-05

Alignments

>gi|3132709|gb|AAC16334.1| (AF062379) Rad51 homolog [Leishmania major]
Length = 377

Score = 60.5 bits (145), Expect = 2e-08
Identities = 27/29 (93%), Positives = 29/29 (99%)
Frame = +2

Query: 8 IMKVYDSPCLAEAEAIIFGIYEDGVGDARD 94
I+KVYDSPCLAEAEAIIFGIY+DGVGDARD
Sbjct: 349 IIKVYDSPCLAEAEAIIFGIYDDGVGDARD 377

>gi|2108337|emb|CAA73605.1| (Y13144) Rad51 homologue [Trypanosoma brucei]
Length = 313

Score = 57.0 bits (136), Expect = 2e-07
Identities = 25/29 (86%), Positives = 28/29 (96%)
Frame = +2

Query: 8 IMKVYDSPCLAEAEAIIFGIYEDGVGDARD 94
I+KVYDSPCLAE+EAIFGIYE+GVGD RD
Sbjct: 285 IIKVYDSPCLAESEAIIFGIYENGVGDVRD 313

>gi|5802566|gb|AAD51713.1|AF174136_1 (AF174136) RAD51 [Trypanosoma brucei]
Length = 373

Score = 57.0 bits (136), Expect = 2e-07
Identities = 25/29 (86%), Positives = 28/29 (96%)
Frame = +2

Query: 8 IMKVYDSPCLAEAEAIIFGIYEDGVGDARD 94
I+KVYDSPCLAE+EAIFGIYE+GVGD RD
Sbjct: 345 IIKVYDSPCLAESEAIIFGIYENGVGDVRD 373

Figura 9: Pesquisa de homologia utilizando a seqüência da EST A1667881 através do programa blast x. Em negrito, *Rad51* de *T. brucei*.

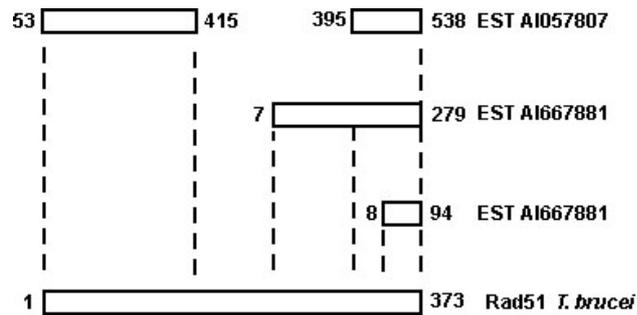
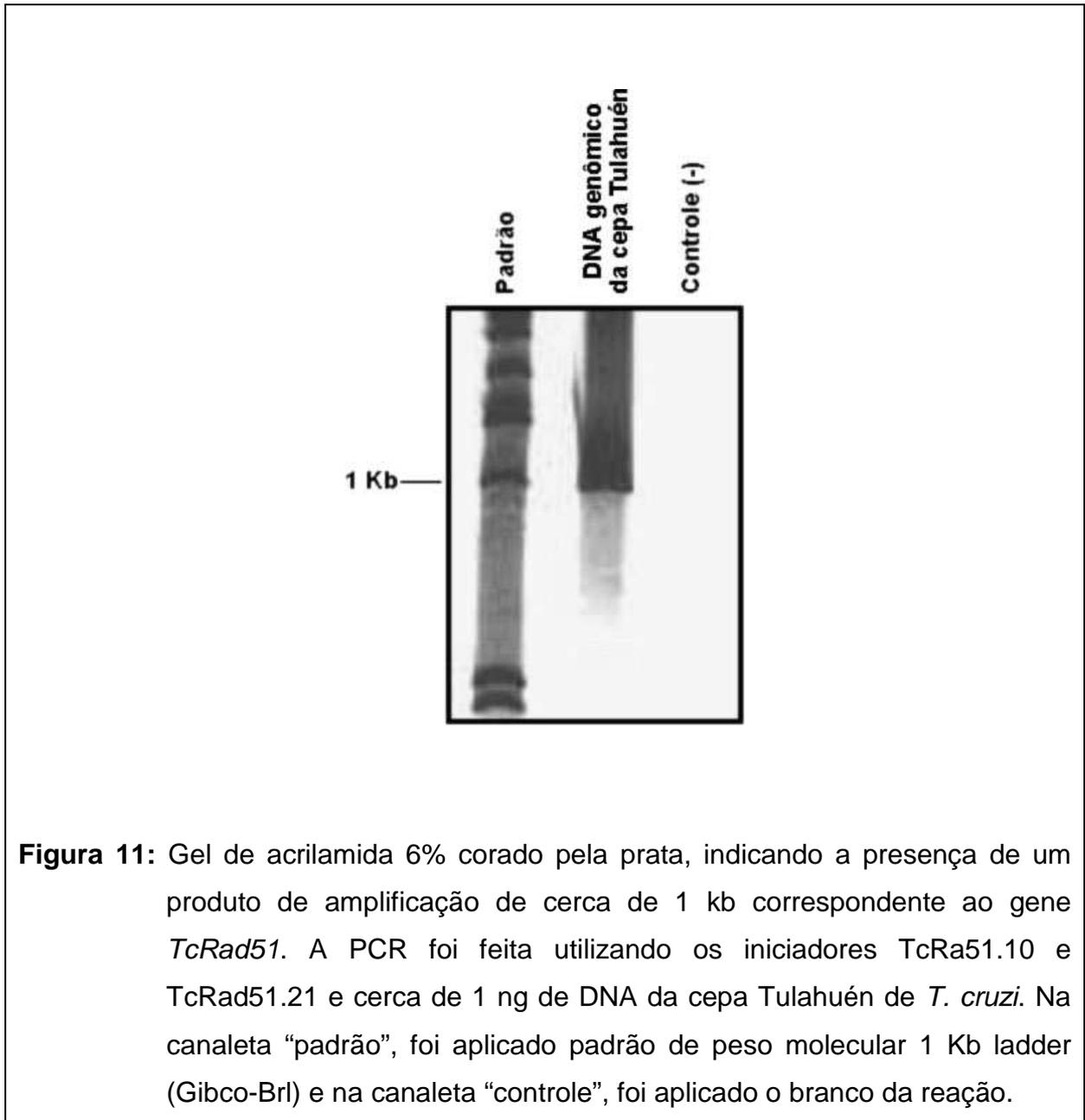


Figura 10: Alinhamento entre a proteína Rad51 de *T. brucei*, e as ESTs de *T. cruzi*. Esse alinhamento foi feito segundo resultado do blast x, a numeração nas ESTs corresponde a seqüência de nucleotídeos e não a de proteínas como é o caso da seqüência de Rad51 de *T. brucei*.

4.2. Amplificação e clonagem do gene *Rad51* do *Trypanosoma cruzi* (*TcRad51*)

Com o par de iniciadores TcRad51.10 e TcRad51.21, foi feita uma PCR a partir de DNA genômico total da cepa Tulahuén de *T. cruzi* e o produto foi analisado através de eletroforese em gel de acrilamida 6% corado com prata (Figura 11). Foi verificada a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1 kb que corresponde a um tamanho esperado uma vez que a maior parte dos genes *Rad51* de outros organismos tem uma janela aberta de leitura variando de 1100 a 1300 nucleotídeos. Este fragmento foi purificado e clonado no vetor pGEM-Teasy (Promega). Inicialmente, uma seqüência do gene foi obtida através de seqüenciamento automático. A pesquisa utilizando o programa blast x revelou que o gene clonado se tratava de uma recombinase sendo que a homologia maior era com proteínas Rad51.



4.3. Obtenção da seqüência completa do gene *TcRad51*

O seqüenciamento inicial do gene *TcRad51* revelou a presença de um sítio de restrição para a enzima *EcoRI* na posição 475-481, o que permitiu a subclonagem de dois fragmentos do gene contendo 477 e 639 pb. Uma vez que o vetor pGEM-Teasy possui dois sítios para essa enzima em sua região múltipla de clonagem, nós

realizamos a digestão do plasmídeo original com *EcoRI* e posteriormente fizemos a religação dos produtos digeridos. Assim, como mostrado na Figura 12, o vetor pGEM-Teasy carregando o gene *TcRad51* digerido com *EcoRI* dá origem a três fragmentos: o fragmento de cerca de 3 Kb correspondente ao vetor, e os outros dois fragmentos de cerca de 500 e 600 pb correspondentes ao gene *TcRad51* digerido. Após a religação utilizando a enzima T₄ DNA ligase o DNA foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* competentes. Foi feita uma PCR de colônia utilizando os iniciadores M13 universal e reverso para se determinar às colônias de interesse. Colônias contendo os dois subclones de *TcRad51* foram selecionadas e cultivadas durante a noite em meio 2xYT contendo 100 µg/mL ampicilina. Com a montagem das seqüências derivadas dos dois fragmentos foram obtidas seqüências completas das duas fitas, permitindo que todo o gene *TcRad51* tivesse ambas as fitas seqüenciadas. A análise da seqüência utilizando o programa *ORFfinder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) prediz que o gene *TcRad51* possui uma janela aberta de leitura de 1116 pares de base, a qual codifica uma proteína de 371 aminoácidos (Figura 13).

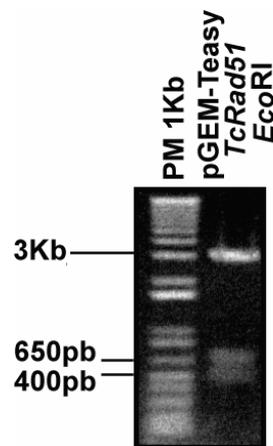


Figura 12: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, indicando a digestão com *EcoRI* do vetor pGEM-Teasy contendo o gene *TcRad51*. Como padrão de peso molecular foi utilizado o 1 kb ladder (Gibco-BRL).

```

1 ATGAacacccgctccaagagaggcaagcgaagggcgcttgaggaggtggaggtccatgagattgcg
M N T R S K R G K R K G V E E V E V H E I A
67 aacacctcgcccgatcccgttgacgccccgaacagcagcaacagcagcaggaggatcaacaaaat
N T S P D P V A A P E Q Q Q Q Q Q E D Q Q N
133 gtggatggcgcgaaacaacggcggccttcgcttatccaagtgcctagaaagctacggattgcctct
V D G A N N G G F R V I Q V L E S Y G I A S
199 gcagacattaaaaagctcatggagtctggtttctacaccgtcgagtcagtcgcgtacgcacccaaa
A D I K K L M E S G F Y T V E S V A Y A P K
265 aaaaacattttggctgtcaagggtatcagtgaaacgaaggcggataaaattatggcggaatgcgcg
K N I L A V K G I S E T K A D K I M A E C A
331 aattggtaccaatgggctttacatccgcagtggtttaccacgaggcagtaaggagatcatcatg
K L V P M G F T S A V V Y H E A R K E I I M
397 gtgactaccggcagtcgggaggtggataaaactgctcgggtggggcattgagactggcggcatcacg
V T T G S R E V D K L L G G G I E T G G I T
463 gagttggtgggggaattccgtacaggcaagacacaactatgtcacaccctgtgcgtcacatgtcaa
E L L G E F R T G K T Q L C H T L C V T C Q
496 ctgcccattttcacagggtggtgctggagggaatggcactgtacattgacacagagggcaccttccga
L P I S Q G G A E G M A L Y I D T E G T F R
562 cccgaacgattggttgacgttgcggaacgttataaaacttgatccacaagacgtgctttccaacgctc
P E R L V A V A E R Y K L D P Q D V L S N V
628 gcctgctcacgtgccttaacaccgatcatcaacaacagttggtgcttcaggcatctgcaatgatg
A C A R A F N T D H Q Q Q L L L Q A S A M M
694 gctgaaaaatcgttttgccatcatcatcgttgactctgccactgcactctaccgcacggactatagt
A E N R F A I I I V D S A T A L Y R T D Y S
760 ggacgtaataaacttgacgaagacagatgcatccttggaagtttcttctctctgcataatcctt
G R N E L A A R Q M H L G K F L R S L H N L
826 gcgagggaatatggcgtggctgtagtcgttacaaatcaggttgctcctaattggtgatggctctgca
A E E Y G V A V V V T N Q V V A N V D G S A
892 caaatgtttcaggcagatgcaaaaaagccattggcggccatattatggcgcgatgctccaccacc
Q M F Q A D A K K P I G G H I M A H A S T T
958 cgactgagtcttcgcaagggacggggtgaacagcgcacatgaaagtgtacgactcaccttgctc
R L S L R K G R G E Q R I M K V Y D S P C L
1024 gccgaggcagagccatatttggcatctacgaggatggcgttggggatgcaagggattga 1116
A E A E A I F G I Y E D G V G D A R D *

```

Figura 13: Seqüência completa do gene e da proteína Rad51 de *T. cruzi*. Está indicado o códon de iniciação da tradução (ATG) e sublinhado, o códon de terminação (TGA). Em negrito, o sítio de restrição da enzima *EcoRI*. Os números à esquerda correspondem aos nucleotídeos da seqüência.

A análise da seqüência de *TcRad51* no programa blast x indicou que o produto desse gene apresenta homologia com Rad51 de diversos organismos incluindo *Leishmania major* (77% de identidade e 73% de similaridade) e *Trypanosoma brucei* (75% de identidade e 69% de similaridade). Além de Rad51, a seqüência apresenta homologia significativa com proteínas DMC1 e Lim15, que são recombinases associadas ao processo de meiose e com proteínas RadA de arqueobactérias que também são recombinases (Figura 14).

Sequences producing significant alignments:			Score	E
			(bits)	Value
gi 3132709 gb AAC16334.1	(AF062379)	Rad51 homolog [Leishma...	530	e-150
gi 5802566 gb AAD51713.1 AF174136_1	(AF174136)	RAD51 [Trypa...	493	e-138
gi 2108337 emb CAA73605.1	(Y13144)	Rad51 homologue [Trypan...	462	e-129
gi 4996226 dbj BAA78377.1	(AB020740)	Rad51 [Cynops pyrrhog...	402	e-111
gi 2500105 sp Q91918 R511_XENLA		DNA REPAIR PROTEIN RAD51 HO...	399	e-110
gi 14749115 ref XP_031515.1	(XM_031515)	RAD51 (S. cerevisi...	399	e-110
gi 395377 emb CAA80878.1	(Z24756)	RecA-like protein [Schiz...	373	e-102
gi 3132711 gb AAC16335.1	(AF062380)	Dmcl homolog [Leishman...	280	1e-74
gi 2058711 gb AAB53331.1	(U94994)	Dmcl homolog [Bombyx mori]	274	1e-72
gi 10944306 dbj BAB16892.1	(AB041944)	DMC1 [Cynops pyrrhog...	272	5e-72
gi 11994855 dbj BAB19960.1	(AB047581)	DMC1 homologue CnDMC...	271	6e-72
gi 585771 sp P37384 DMC1_LILLO		MEIOTIC RECOMBINATION PROTEI...	270	2e-71
gi 6753650 ref NP_034189.1	(NM_010059)	disrupted meiotic c...	270	2e-71
gi 1363937 pir JC4333		meiosis-specific RecA-like protein -...	270	2e-71
gi 12742813 ref XP_013009.1	(XM_013009)	DMC1 (dosage suppr...	269	3e-71
gi 14669854 dbj BAB62026.1	(AB065111)	RiLIM15A [Oryza sativa]	268	5e-71
gi 3219787 sp Q96449 DMC1_SOYBN		MEIOTIC RECOMBINATION PROTE...	267	2e-70
gi 2500101 sp Q39009 DMC1_ARATH		MEIOTIC RECOMBINATION PROTE...	254	1e-66
gi 8307944 gb AAF74403.1 AF198107_3	(AF198107)	DNA repair p...	226	3e-58
gi 6714639 dbj BAA89533.1	(AB036801)	LIM15/DMC1 homolog [C...	225	5e-58
gi 12655203 gb AAH01459.1 AAH01459	(BC001459)	Unknown (prot...	216	3e-55
gi 14600463 ref NP_146978.1	(NC_000854)	rada protein [Aero...	187	1e-46
gi 15669060 ref NP_247864.1	(NC_000909)	DNA repair protein...	187	2e-46
gi 2146707 pir S71095		rada protein - Methanococcus jannaschii	187	2e-46
gi 13878668 sp O73948 RADA_METVO		DNA REPAIR AND RECOMBINATI...	187	2e-46
gi 13541288 ref NP_110976.1	(NC_002689)	RadA recombinase [...	186	3e-46
gi 16082126 ref NP_394563.1	(NC_002578)	probable DNA repai...	186	3e-46

Figura 14: Resultado da pesquisa de homologia utilizando a seqüência do gene *TcRad51* através do programa blast x. Em negrito, são destacados além de Rad51, DMC1, RadA e LIM15.

4.4. Análise da proteína TcRad51

As recombinases Rad51 são proteínas bastante conservadas em eucariotos, guardando ainda certo grau de homologia com recombinases bacterianas. O alinhamento da seqüência de TcRad51 com proteínas Rad51 de vários organismos revela tal conservação (Figura 15). A região central e C-terminal das proteínas são bastante similares, havendo um grande número de aminoácidos idênticos entre as seqüências.

Foram utilizados programas disponíveis na internet com o objetivo de melhor caracterizar, *in silico*, a proteína Rad51 de *T. cruzi*. O peso molecular e ponto isoelétrico teóricos foram determinados através da ferramenta ProtParam, a qual

pode ser acessada no endereço <http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>. O peso molecular da proteína TcRad51 é de 40.430,96 Da e o ponto isoelétrico de TcRad51 é 5,84, indicando portanto que a proteína tem características ácidas.

A identificação de domínios protéicos foi feita utilizando o sítio InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>). Foram identificados pelo menos duas regiões funcionais encontradas em famílias protéicas e um domínio de ligação de DNA. Além disso, foram detectadas regiões características de recombinases. Uma das regiões funcionais corresponde ao motivo de ligação de ATP/GTP tipo Walker A (Figura 16). Esse motivo já foi encontrado em cerca de 3731 proteínas envolvidas em diferentes processos celulares, bem como nas proteínas Rad51 de outros organismos. A segunda região funcional é característica das AAA-ATPases (Figura 16), que são ATPases associadas a uma variedade de atividades celulares. Proteínas com essa região são sempre associadas com um motivo de ligação a ATP, que no caso de TcRad51 é o motivo tipo Walker A. Em geral, essas enzimas utilizam a hidrólise de ATP ou GTP não para gerar a energia para promover uma reação química, mas sim para modular a função protéica como é caso do Fator de Elongação ligado a GTP, proteína envolvida no processo de transcrição. O domínio encontrado em TcRad51 corresponde a um motivo hélice-grampo-hélice cuja função é a ligação a DNA em regiões não específicas (Figura 16). Esse motivo também é encontrado em diversas proteínas de procariotos e eucariotos tal como os outros dois motivos.

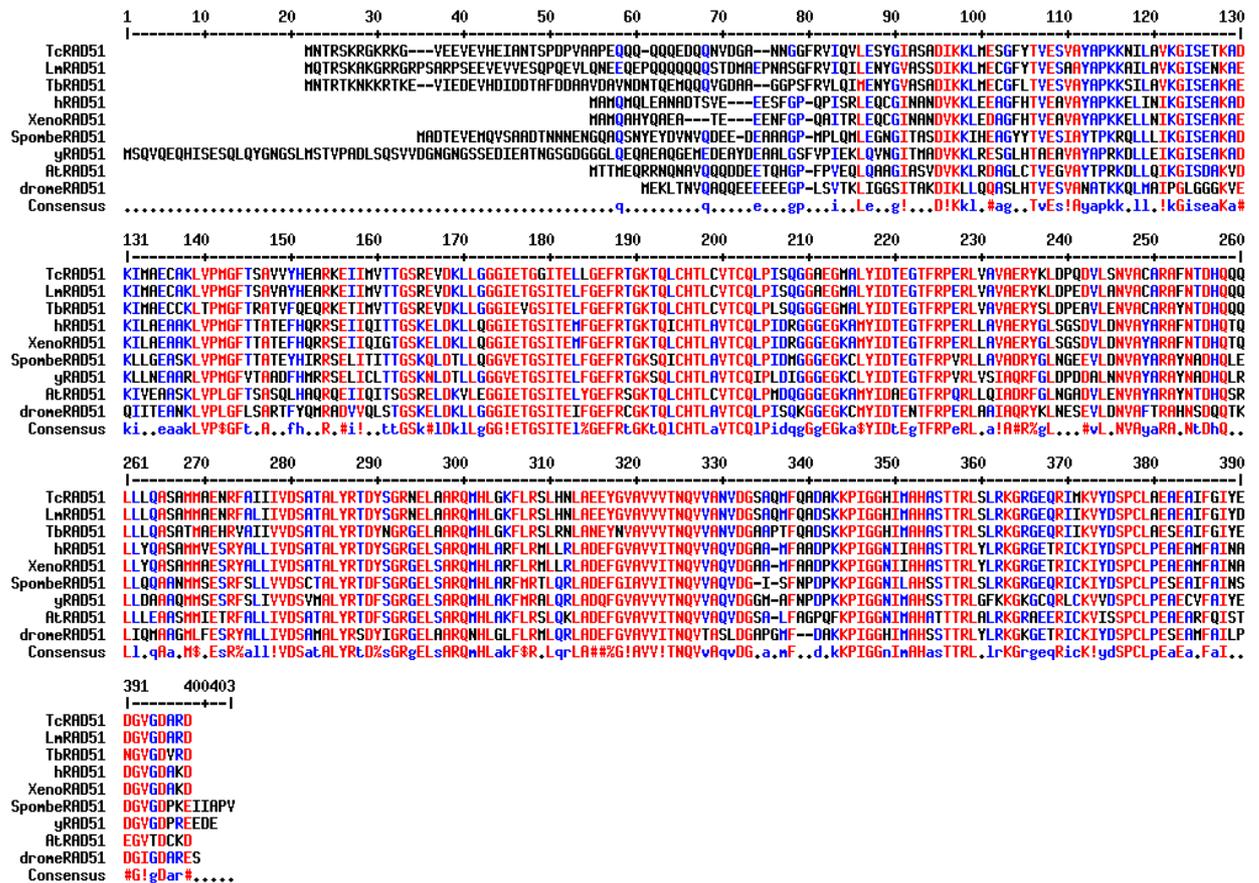


Figura 15: Alinhamento das seqüências da proteína Rad51. O programa utilizado foi o MultiAlign (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). Em vermelho, são destacados aminoácidos similares em todas as seqüências. Em azul, destacam-se aminoácidos conservados na maior parte das proteínas Rad51. Tc se refere a *T. cruzi*; Tb, *T. brucei*; Ln, *Leishmania major*; h, *Homo sapiens*; Xeno, *Xenopus laevis*; Spombe, *Schizosaccharomyces pombe*; y, *Saccharomyces cerevisiae* e drone, *Drosophila megalonogaster*.

McCulloh e Barry clonaram o gene *Rad51* de *T. brucei* e mostraram que o produto desse gene possui doze resíduos de aminoácidos que são conservados em 23 seqüências de RecA bacterianas, em DMC1 de *Saccharomyces cerevisiae* e também em USVX de bacteriófago T₄. A estrutura tridimensional de RecA indica que esses resíduos estão localizados no sítio ativo da enzima. Assim como a proteína de *T. brucei*, a recombinase de *T. cruzi* possui esses doze resíduos conservados (Figura 16).

```

1  MNTRSKRGKR  KGVVEEVVHE  IANTSPDPVA  APEQQQQQQE  DQONVDGANN
51  GGFRVIQVLE  SYGIASADIK  KLMESGFYTV  ESVAYAPKKN  ILAVKGISET
101 KADKIMAECA  KLVPMGFTSA  VVYHEARKEI  IMVTTGSREV  DKLLGGGIET
151 GGITELLGEF RTGKTQLCHT  LCVTCQLPIS  QGGAEGMALY  IDTEGTFRPE
201 RLVAVAERYK  LDPQDVLSNV  ACARAFNTDH  QQQLLLQASA  MMAENRFAII
251 IVDSATALYR  TDYSGRNELA  ARQMHLGKFL  RSLHNLAEY  GVAVVVTNQV
301 VANVDGSAQM  FQADAKKPIG  GHIMAHASTT  RLSLRKGRGE  QRIMKVYDSP
351 CLAEAEAIFG  IYEDGVGDAR  D

```

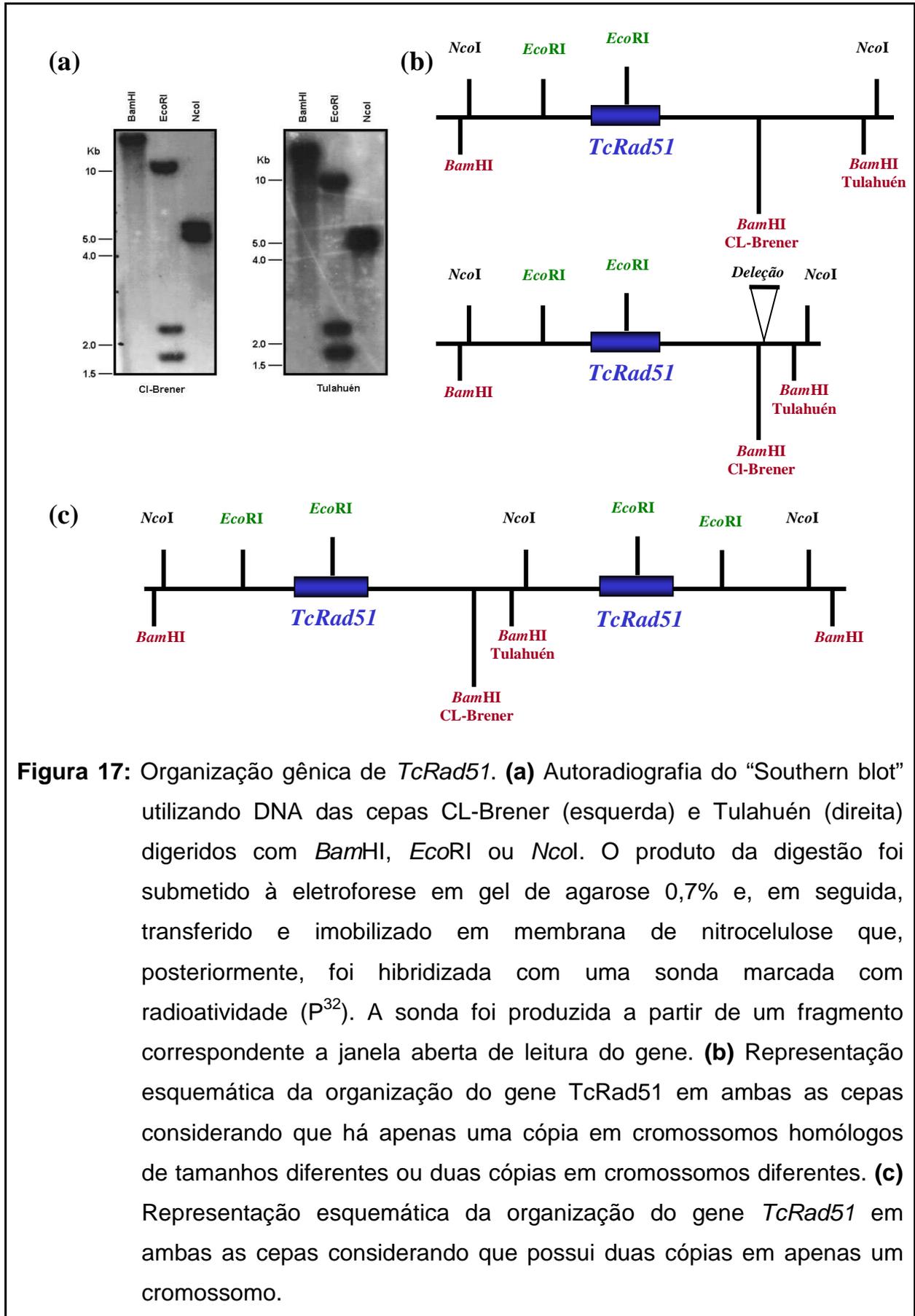
Figura 16: Regiões da proteína TcRad51 caracterizadas pelo programa InterProScan. Em azul, motivo hélice-grampo-hélice. Em vermelho, motivo da superfamília das AAA ATPases. O fundo amarelo indica resíduos característicos do motivo de ligação a ATP/GTP tipo Walker A. Em verde, resíduos de aminoácidos conservados em 23 seqüências de RecA bacterianas, Dmc1 de *Saccharomyces cerevisiae* e UVSX do bacteriófago T₄.

4.5. Organização do gene *TcRad51* no genoma do *T. cruzi*

A técnica de “Southern blot” permite que se determine a estrutura gênica e a organização de um certo gene em um genoma (Sambrook *et al.*, 1989). Por isso utilizamos esta técnica na tentativa de estimar o número de cópias do gene *TcRad51*. DNA genômico das cepas Tulahuén e CL-Brener de *T. cruzi* foram

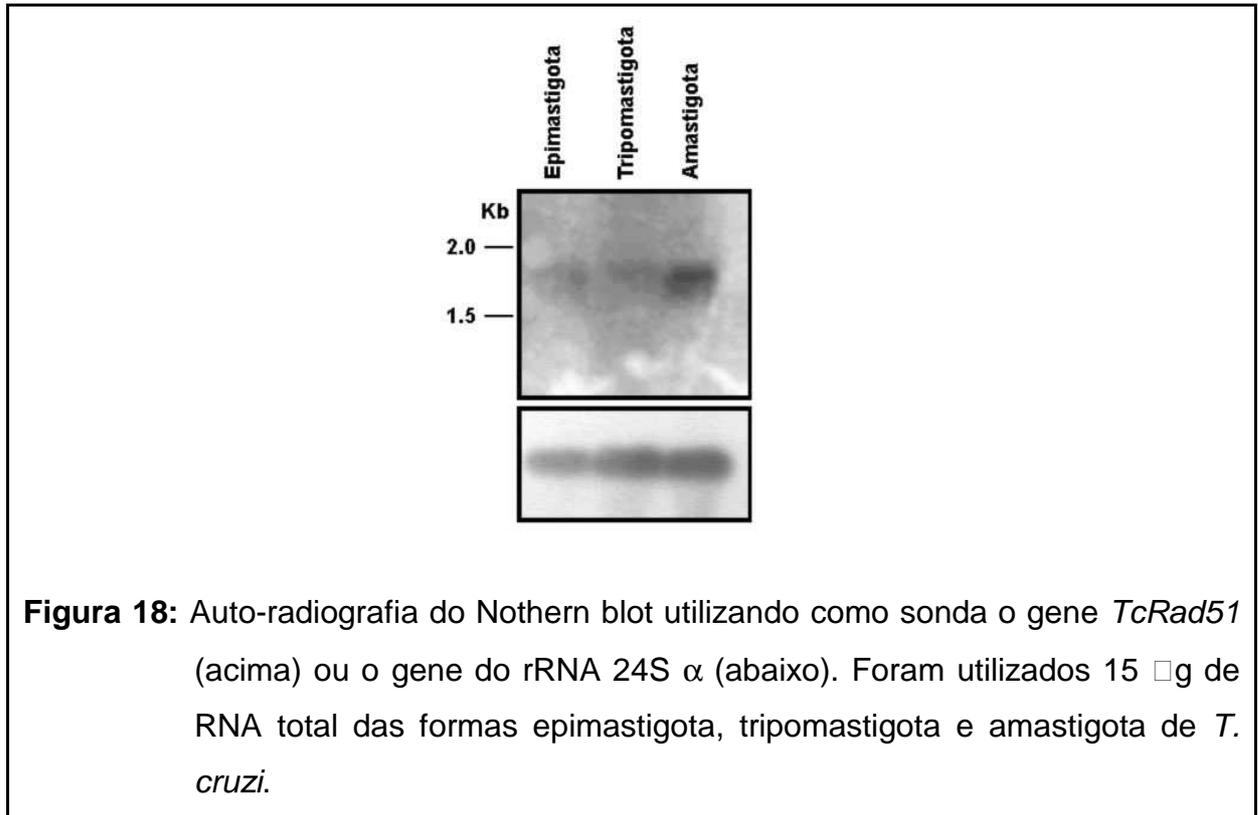
digeridos com as enzimas *EcoRI*, *NcoI* e *BamHI*. A primeira enzima cliva *TcRad51* em apenas um ponto dividindo a janela aberta de leitura em dois fragmentos de um pouco mais de 400 e 600pb. Já as duas últimas enzimas não clivam o gene *TcRad51*. O resultado do “Southern blot” indicou o seguinte padrão de bandas (Figura 17a): (i) a digestão com *EcoRI*, que cliva *TcRad51* em apenas um ponto, resultou em três bandas para ambas as cepas; (ii) a digestão com *NcoI*, que não cliva *TcRad51*, apresenta duas bandas em ambas as cepas; (iii) a digestão com *BamHI*, que também não cliva *TcRad51*, apresenta duas bandas na cepa Tulahuén e apenas uma na cepa CL-Brener. Como os tamanhos são bastante elevados (> 10 kb) a visualização das duas bandas na cepa Tulahuén fica um pouco dificultada.

Este padrão indica que pode haver uma ou duas cópias desse gene no genoma das cepas Tulahuén e CL-Brener de *T. cruzi*. Esse organismo possui uma complexidade muito grande em sua organização cromossômica. Cromossomos homólogos podem apresentar deleções ou inserções, dessa forma esses cromossomos podem apresentar tamanhos diferentes (Degrave *et al.*, 2001). Considerando essa informação, poderíamos postular que o gene *TcRad51* apresenta uma única cópia em cromossomos homólogos de tamanhos diferentes, como ilustrado na Figura 17b. Uma segunda hipótese, embora pouco provável, pressupõe a existência de duas cópias do gene *TcRad51*, cada uma em um cromossomo diferente, mas que apresentam um padrão de digestão bastante parecido, similar ao padrão de digestão apresentado por cromossomos homólogos (Figura 17b). Uma terceira explicação, e talvez a mais provável, visto que os genes de *T. cruzi* são freqüentemente encontrados organizados *em tandem* no genoma, prediz a existência de duas cópias ligadas em um único cromossomo (Figura 17c).



4.6. Expressão do gene *TcRad51* nas formas epimastigota, tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*

A técnica de “Northern blot” pode ser utilizada para se verificar a presença de um transcrito específico expresso por células de um organismo com base na complementaridade existente entre o RNA mensageiro (mRNA) e uma sonda radioativa construída a partir do gene de interesse (Sambrook *et al.*, 1989). Essa técnica foi utilizada na caracterização do mRNA de *TcRad51* nas três fases do ciclo de vida do *T. cruzi*. Para isso, foi extraído o RNA total das formas epimastigota, tripomastigota e amastigota. Após eletroforese em gel de agarose, esses RNAs totais foram transferidos e imobilizados em uma membrana de nitrocelulose. Em seguida, essa membrana foi hibridizada com uma sonda marcada radioativamente com P³² construída a partir de toda a janela aberta de leitura do gene. Para a normalização dos resultados, a mesma membrana foi hibridizada novamente com uma sonda correspondente ao gene de rRNA 24S. Em todas as fases do *T. cruzi*, há um único mRNA de cerca de 1,7 kb transcrito em níveis relativamente baixos (Figura 18). A análise de densitometria de bandas, levando em consideração as variações observadas em relação aos sinais de rRNA, indica que os níveis de mRNA na forma amastigota são duas vezes mais elevados quando comparados com as duas outras formas.



4.7. Atividade funcional do gene *TcRad51* em *E. coli*

A expressão de genes envolvidos no metabolismo de DNA em *E. coli* pode levar a indução do sistema S.O.S. (Perkins *et al.*, 1999). Por isso, investigamos a capacidade do gene *TcRad51* em induzir uma resposta S.O.S. através do ensaio de mutagênese em linhagens dessa bactéria. As linhagens DH5- α ($recA^-$) e AB1157 ($RecA^+$) foram utilizadas nesse ensaio. Ambas são sensíveis ao antibiótico rifampicina. Elas foram transformadas com plasmídeos pUC18 contendo ou não um inserto correspondente ao gene *TcRad51*. Após crescimento por 16 h, as bactérias foram plaqueadas em meio contendo apenas ampicilina ou rifampicina e ampicilina como descrito em **Material e Métodos**. As colônias crescidas em todas as placas são contadas. Durante o crescimento bacteriano, as mutações podem ocorrer aleatoriamente. Caso ocorram no início, um grande número de mutantes resistentes a rifampicina será detectado. Por outro lado, se ocorrerem mais no final, o número de mutantes será menor. Portanto, são necessários vários experimentos para se avaliar a taxa de mutação que é, em seguida, corrigida através de cálculo de flutuação (Lea & Coulson, 1949). Posteriormente, determina-se a relação entre o número de

mutantes (colônias que cresceram em rifampicina e ampicilina) e o número total de bactérias (titulado a partir das colônias crescidas apenas em ampicilina). A linhagem DH5- α apresentou um número de mutantes inferior a 1 por 10^8 células tanto na ausência quanto na presença da expressão de *TcRad51* (Tabela IV). Já a linhagem AB1157 apresentou um número dez vezes maior de mutantes quando transformadas com o plasmídeo pUC18 contendo o gene *TcRad51* quando comparadas às bactérias transformadas com pUC18 sem inserto.

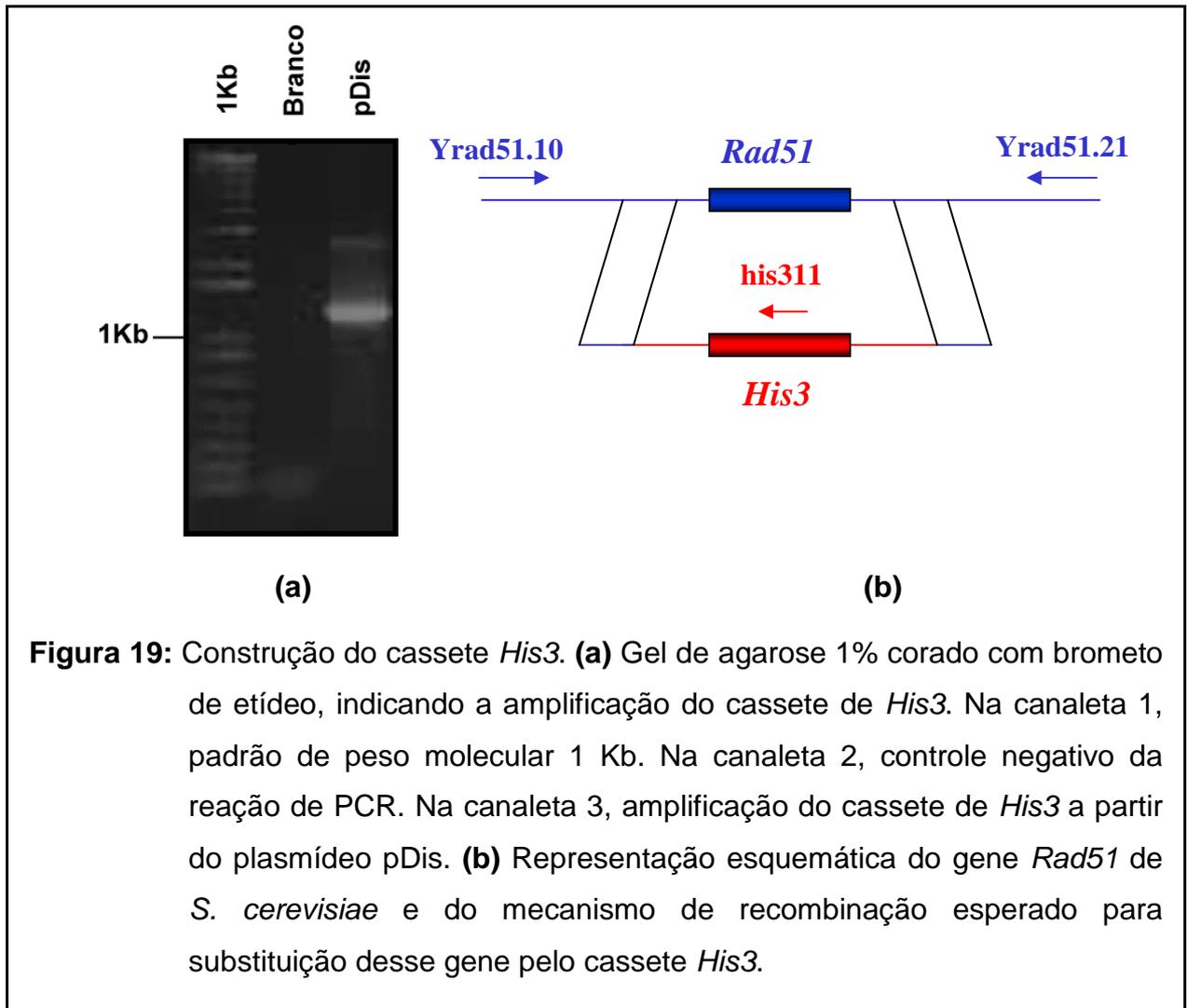
Tabela IV: Taxa de mutação* de bactérias AB1157 e DH5- α expressando ou não *TcRad51*.

Linhagem	Expressão de <i>TcRad51</i>	No. de mutantes/ 10^8 células
AB1157	-	0,71
AB1157	+	7,8
DH5- α	-	<0,1
DH5- α	+	<0,1

*Os mutantes são detectados pela sua habilidade de crescer em rifampicina a 37°C por 16 h.

4.8. Atividade funcional do gene *TcRad51* em *S. cerevisiae*

Para melhor caracterizar o produto do gene *TcRad51*, construímos uma levedura nocaute para o gene *Rad51* e investigamos a atividade funcional do gene de *T. cruzi* nessa levedura. Para a construção do nocaute, foi feita uma amplificação pela PCR de um cassete que continha o gene *His3*, cujo produto participa na síntese de histidina. Nessa PCR, foram utilizados iniciadores denominados rad51his310 e rad51his321 e como DNA molde, o plasmídeo pDIS. Esses iniciadores possuem uma região de 40 nucleotídeos homóloga à região 5' do gene *Rad51* de *S. cerevisiae* para o caso de rad51his310 e à região 3', no caso de rad51his321. Nos mesmos iniciadores, estão presentes 20 nucleotídeos que se anelam com a seqüência do gene *His3*. Assim, o produto da PCR terá a seqüência *His3* flanqueada por regiões homólogas à *Rad51* de levedura. Este produto foi visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (Figura 19a). A inserção do cassete ocorre por recombinação (Figura 19b) e as leveduras que tiveram tal fragmento inserido no genoma ganham a habilidade de crescer em meio mínimo sem histidina. Além disso, o produto da amplificação desta região no genoma da levedura após o evento de recombinação, utilizando os iniciadores Yrad51.10 e Yrad51.21, terá seu tamanho aumentado de 1400 pb para 1600 pb, o que permite eliminar os falsos positivos através da PCR.



Após a obtenção do cassete, as leveduras foram transformadas com o cassete *His3* e selecionadas em meio mínimo sem histidina. Obtivemos 25 colônias. Dessas, vinte e quatro apresentavam um produto de amplificação de 1400 pb, com os iniciadores Yrad5110 e Yrad5121, sendo, portanto, *Rad51*⁺. Para uma única colônia, identificada pelo número 18, não foi detectado nenhum produto de amplificação. Para essa colônia, foi feita uma nova PCR utilizando o par de iniciadores Yrad5110 e his311. O primeiro iniciador é externo ao local de inserção do cassete e o segundo se anela no cassete. Portanto a amplificação só é esperada caso o cassete tenha sido corretamente inserida no genoma da levedura. O produto dessa amplificação, um fragmento de 840 pb (Figura 20), indica que houve, neste clone a substituição do gene *Rad51* pelo cassete de *His3*.

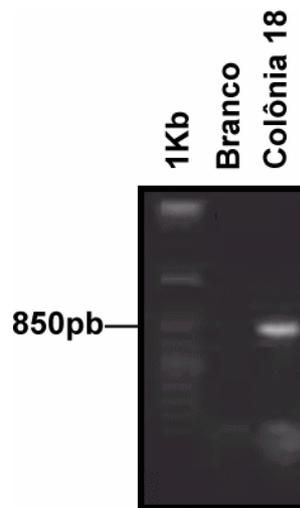
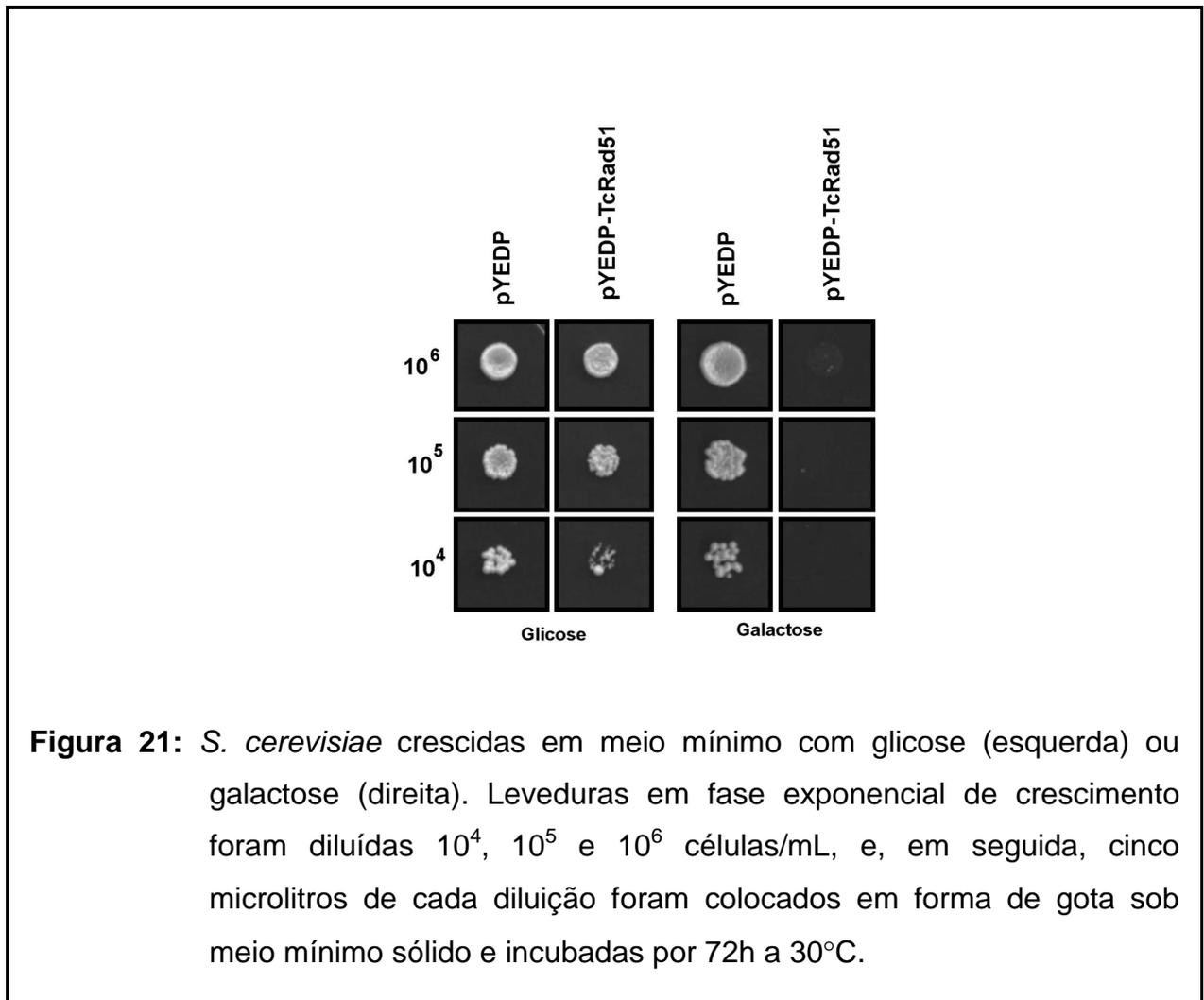


Figura 20: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo indicando a amplificação do fragmento de 840pb utilizando DNA da colônia 18 como molde.

O gene *TcRad51* foi clonado em pYEPD no sítio de *SmaI*. Nesse plasmídeo, o gene inserido no sítio de clonagem fica sob controle de um promotor induzido por galactose. Além disso, ele possui o gene *ADE2-1* que permite que a levedura cresça na ausência de adenina. As leveduras $\Delta rad51::His3$, após crescerem até a fase exponencial, foram transformadas com plasmídeo pYEPD controle (sem inserto) e com o plasmídeo pYEPD-TcRad51. Em seguida, as leveduras foram plaqueadas em meio SD mínimo sem histidina e sem adenina. A presença do gene *TcRad51* foi confirmada por PCR de colônia utilizando os iniciadores TcRad51.10 e TcRad51.21.

Após crescimento de 16 h (durante a noite) em meio SD líquido sem histidina e adenina, as células foram contadas e foi feito um novo inóculo na densidade de 5×10^6 células/mL. Após atingir a densidade de cerca de $1,6 \times 10^7$ células/mL, essas células foram diluídas em série para 10^6 , 10^5 e 10^4 células/mL e 5 μ L de cada diluição foram plaqueados em forma de gota em uma placa contendo glicose e em outra contendo galactose, esta última, capaz de induzir a expressão de *TcRad51*. As leveduras $\Delta rad51::His3$ transformadas apenas com plasmídeo pYEPD não apresentaram grandes diferenças no crescimento quando em presença de galactose ou glicose (Figura 21). Entretanto, as leveduras $\Delta rad51::His3$ transformadas com

plasmídeo contendo o gene *TcRad51* cresceram apenas na presença de glicose. Em meio contendo galactose, o crescimento foi abolido ou severamente reduzido devido a um efeito de dominância negativa.



4.9. Evolução molecular do gene *TcRad51* em *T. cruzi*

O *T. cruzi* apresenta uma variedade de cepas agrupadas em duas linhagens filogenéticas distintas. Essas linhagens são definidas por uma série de polimorfismos associados, por exemplo, a RNA ribossômico, mini-éxon, minicírculos, microssatélites, entre outros e foram chamadas *T. cruzi* I ou *T. cruzi* II (Momen, 1999). Análises utilizando o gene para a pequena subunidade do RNA ribossômico indicam que a separação dessas cepas ocorreu entre 37 e 88 milhões de anos atrás

(Briones *et al.*, 1999), e, portanto, essas cepas evoluem de forma independente. Baseando-se nessas informações, partimos para investigar a presença de polimorfismos em um fragmento do gene *TcRad51* em 10 cepas de *T. cruzi*. Esse fragmento se inicia no primeiro nucleotídeo da janela aberta de leitura e se prolonga até o nucleotídeo 359. A amplificação do fragmento pela PCR foi feita para as cepas 222, 231, 1005, Tulahuén, 115, 167 e 239, pertencentes ao grupo *T. cruzi* II e Colombiana, RB1 e D7 pertencentes ao grupo *T. cruzi* I. Foi feita a clonagem dos fragmentos correspondentes a parte do gene *TcRad51* da várias cepas no vetor pCR-II utilizando o kit Topo (Invitrogen). Em seguida, foi obtida a seqüência de ambas as fitas de quatro clones para cada cepa, exceção de 1005 e Tulahuén, para as quais foram obtidas apenas três seqüências. Os iniciadores M13 universal e M13 reverso foram utilizados na obtenção das seqüências. Para cada cepa, foi produzida uma seqüência consenso pelo alinhamento das seqüências obtidas com os dois iniciadores. Durante esse processo, foram verificados sítios polimórficos em seqüências geradas a partir de uma mesma cepa, indicado a presença de mais de um alelo. Em algumas cepas, foram identificados três alelos diferentes, indicando que há, no mínimo, duas cópias do gene *TcRad51* no genoma do *T. cruzi* (veja resultados de “*Southern blot*”). Foi produzido um total de 20 seqüências e as análises mostraram que as cepas Tulahuén, 239 e 1005 possuem um alelo, 231, D7 e RB1 possuem dois alelos, e as outras cepas possuem três alelos. O alinhamento das seqüências de nucleotídeos permitiu a identificação de um total de 13 polimorfismos (Figura 22). Esses polimorfismos resultam em cerca de 8 polimorfismos na seqüência de proteínas (Figura 23).

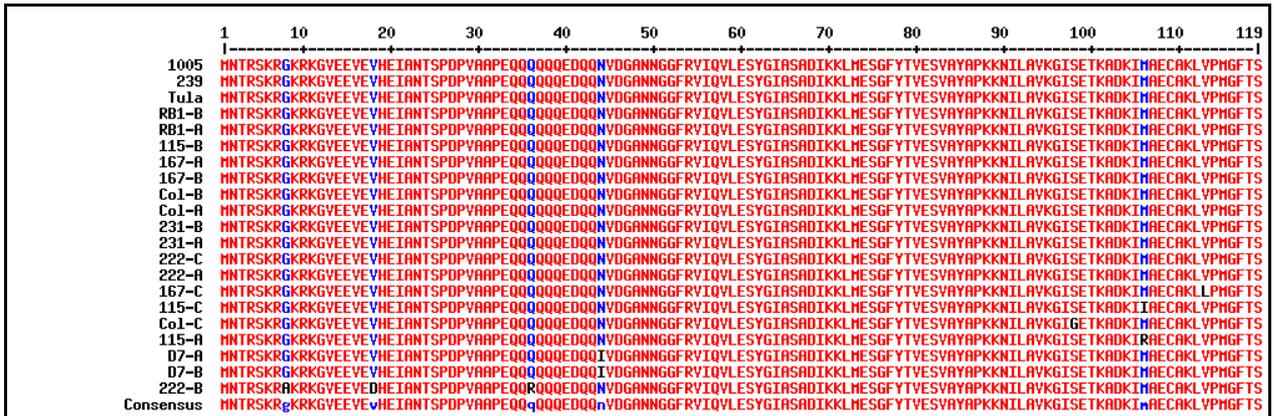


Figura 23: Alinhamento das seqüências de proteínas de alelos TcRad51 das cepas 1005, 239, 167, 115, Tuluahuén (Tula), 222, 231, Colombiana (Col), RB1 e D7.

Com base nos polimorfismos encontrados nas seqüências de nucleotídeos, foi gerada uma matriz, a qual foi, então, utilizada para gerar uma árvore filogenética das cepas (Figura 24). Apesar de valores de ‘bootstrap’ serem baixos para alguns ramos, 73%, 95% e 59%, as cepas de *T. cruzi* foram divididas em três grupos, não estando, portanto, de acordo com a dicotomia previamente descrita para as linhagens de *T. cruzi* (*T. cruzi* I e II). Entretanto, tais resultados apresentam-se em conformidade com dados apresentados por Machado e Ayala, 2001, os quais estudaram os genes tripanotona redutase, diidrofolato redutase-timidilato sintetase e uma região do DNA mitocondrial. Alelos das cepas 167 e 115 foram agrupados em dois ramos diferentes.

Da mesma maneira, os polimorfismos encontrados nas seqüências de aminoácidos da proteína também foram utilizados para gerar uma matriz e, em seguida, uma árvore filogenética. Entretanto, os polimorfismos apresentados nas seqüências protéicas não deram origem a qualquer tipo de divisão significativa entre as cepas.

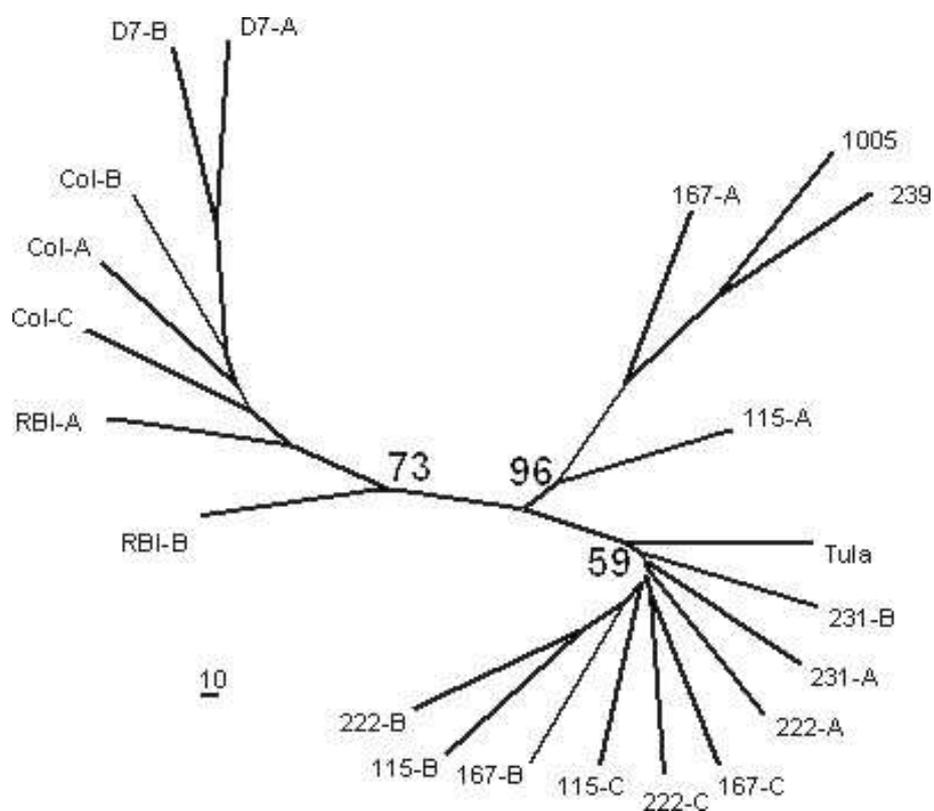


Figura 24: Árvore filogenética baseada em polimorfismos nas seqüências de nucleotídeos do gene *TcRad51*.

DISCUSSÃO

O metabolismo do DNA nas células compreende os processos de replicação, reparo e recombinação. Apesar destes processos serem freqüentemente estudados de maneira independente, nota-se que há uma grande integração entre eles. Um exemplo dessa integração é o reparo de quebra de dupla fita por recombinação homóloga.

Há um alto grau de conservação no processo de recombinação (Kuzminov, 2001), visto que se observa um grande número de proteínas que possuem a mesma função bioquímica quando se compara este processo em bacteriófago T₄, e em organismos como *E. coli* e *S. cerevisiae*. Uma proteína central para o mecanismo de recombinação em eucariotos é o produto do gene *Rad51*, o qual, além de ser bastante conservado nos organismos deste grupo, tem homologia com as proteínas RecA de *E. coli* e UVSX do bacteriófago T₄. Dada a sua função bioquímica, essas proteínas são chamadas de recombinases.

O *Trypanosoma cruzi* é um organismo onde eventos de rearranjo genético são particularmente interessantes uma vez que ele mantém um alto grau de conservação entre alelos de um mesmo gene, o que é pouco esperado para organismos que apresentam reprodução clonal. Assim a identificação e clonagem do gene *Rad51* de *T. cruzi* poderão permitir uma melhor compreensão dos mecanismos de recombinação e da influência desse processo na biologia desse parasito.

Atualmente, cerca de 12% do genoma diplóide de *T. cruzi* apresentam-se depositados em banco de dados que podem ser acessados pelo endereço www.ncbi.nlm.nih.gov (Degrave *et al.*, 2001). Além disso, a seqüência do gene *Rad51* de *T. brucei* já foi caracterizada (McCulloh & Barry, 1999). Com essas informações, o primeiro passo para clonagem de *TcRad51* foi o de pesquisar se haveria alguma EST de *T. cruzi* homóloga ao gene de *T. brucei* utilizando o programa blast n. O resultado de tal pesquisa foi a identificação de uma única EST (AI057807), a qual, ao ser utilizada em uma segunda pesquisa, revelou a presença de mais duas ESTs homólogas (AI562578 e AI667881). O estudo dessas ESTs fez-se necessário para a determinação de qual fragmento do gene havia sido identificado. Então, foram feitas novas pesquisas, dessa vez utilizando o programa blast x que obtém as janelas abertas de leitura das ESTs e faz uma comparação com seqüência de proteínas conhecidas. Duas ESTs, AI562578 e AI667881,

correspondiam apenas a região C-terminal. Já a outra EST apresenta seqüências correspondentes tanto à região C-terminal quanto à N-terminal. Como o tamanho total dessa EST era de 556 nucleotídeos e o tamanho esperado para o gene *TcRad51* varia entre 1100 e 1300 nucleotídeos, foi possível postular que a EST não correspondia ao gene todo e que ela estava truncada possuindo tanto a região 3' quanto a 5' do gene *TcRad51*. Essas ESTs permitiram a identificação dos códons de início e de término da transcrição para esse gene. Assim construímos um par de iniciadores, TcRad51.10 e TcRad51.21, que permitiu a amplificação de toda a janela aberta de leitura do gene *TcRad51*.

O *T. cruzi* é um patógeno eucarioto que mantém certas características de procariotos (Teixeira, 1998). Uma delas é a ausência de introns na grande maioria dos seus genes. Isso facilita a clonagem de um gene visto que o DNA genômico desse organismo pode ser utilizado como molde na PCR. Dessa forma, utilizamos essa técnica para amplificar o gene *TcRad51* a partir de DNA genômico da cepa Tulahuén tendo como iniciadores TcRad51.10 e TcRad51.21. O fragmento amplificado foi então clonado no vetor pGEM-Teasy. Para confirmar que o fragmento clonado realmente continha o gene *Rad51*, obtivemos a seqüência das duas fitas de *TcRad51*, a qual foi, então, submetida a uma pesquisa em banco de dados utilizando o programa blast x. Pelo fato das recombinases apresentarem um caráter bastante conservado, TcRad51 apresentou homologia significativa com diversas dessas proteínas como, por exemplo, DMC1 e Lim15. Entretanto, dois fatores indicam que o gene clonado se trata realmente de Rad51. O primeiro deles é baseado na grande identidade que há entre o produto desse gene e as proteínas Rad51 de *L. major* e *T. brucei*, 77% para o primeiro e 75% no caso do último. Em segundo lugar, como as recombinases DMC1 e Lim15 são associadas ao processo de meiose (Hotta *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 2001), e como esse processo é característico de organismo que se reproduzem sexualmente, podemos inferir que o gene clonado deva corresponder ao ortólogo de Rad51 de *T. cruzi* e não destas recombinases. Portanto, as evidências indicam que o gene por nós clonado é o da recombinase Rad51, embora não se possa descartar que *T. cruzi* possua homólogos aos genes DMC1 e Lim15.

A partir da seqüência de nucleotídeos, podemos obter também a seqüência de aminoácidos e a análise dessa seqüência permitiu que se fizessem previsões

teóricas a respeito da função desta proteína no parasito. Em uma das análises, foi feito o alinhamento de várias seqüências de proteínas Rad51 para identificação de regiões conservadas. A proteína TcRad51 quando comparada a outras recombinases de várias classes de eucariotos possui as regiões central e C-terminal bastante similares. É interessante notar que a maior parte dos domínios funcionais se localiza dentro dessas regiões. À região N-terminal, são atribuídas funções como interação com outras proteínas e domínio de ligação de DNA (Aihara *et al.*, 1999). Entretanto, quando se compara essa mesma região entre *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* observa-se que essa região é também conservada nestes organismos.

O programa ProtoParam foi utilizado para cálculos do peso molecular e do ponto isoelétrico. O peso molecular teórico será de grande utilidade em experiências futuras de obtenção e purificação da proteína TcRad51. O ponto isoelétrico indica que essa proteína é ácida. Isso aparentemente é uma contradição uma vez que TcRad51 interage com DNA, uma molécula também ácida. Mas se considerarmos que o programa utilizado tem como parâmetro toda seqüência da proteína, levando em consideração o equilíbrio de cargas de todo o conjunto de resíduos de aminoácidos, é possível ainda supor que o sítio de ligação ao DNA possua resíduos básicos. Portanto se considerarmos a divisão da proteína em microambientes, e fizermos uma nova predição do ponto isoelétrico teórico, obtemos o valor de 8,1 para os resíduos que compõe esse domínio (hélice-grampo-hélice).

A identificação de domínios funcionais da recombinase TcRad51 foi feita através do programa InterProScan. Dois motivos encontrados são o de ligação a ATP/GTP tipo Walker A e o motivo funcional das AAA-ATPases. Esses motivos são amplamente encontrados em várias proteínas que utilizam a hidrólise do ATP para regulação da função exercida por elas. A importância do mecanismo de hidrólise de ATP não é bem definida. As recombinases têm basicamente duas funções. Uma delas é promover o pareamento entre a fita simples e a dupla fita durante o processo de recombinação (Sung *et al.*, 1997). A outra é promover a invasão da fita simples na fita dupla. A recombinase RecA é capaz de realizar as duas funções apenas com a ligação do ATP sem a necessidade de realizar a hidrólise dessa molécula. Já a proteína Rad51 humana necessita de hidrolisar o ATP para exercer as duas funções (Gupta *et al.*, 1997).

O domínio de ligação a DNA também foi localizado pelo programa InterProScan. Esse domínio corresponde a um motivo hélice-grampo-hélice que compreende os resíduos 79 e 108. Esse motivo também é encontrado em um grande número de proteínas que se ligam ao DNA. As recombinases estudadas até o momento se ligam ao DNA formando filamentos de nucleoproteína. É bem provável que a proteína de *T. cruzi* interaja da mesma forma.

A recombinase de *T. cruzi* possui também doze resíduos de aminoácidos que também são encontrados em 23 proteínas RecA bacterianas, DMC1 de *Saccharomyces cerevisiae* e também em USVX de bacteriófago T4. A estrutura tridimensional de uma proteína RecA indica que eles se localizam no sítio ativo da enzima RecA. As proteínas Rad51 de outros organismos também possuem esses resíduos, ou pelo menos resíduos similares a eles. Três desses resíduos se localizam no motivo de ligação a GTP/ATP tipo Walker A. Embora não se saiba a contribuição exata de cada um dos outros nove resíduos para o funcionamento das recombinases, é provável que eles tenham relação com os mecanismos de catálise dessas proteínas.

A análise da estrutura gênica de TcRad51 por Southern blot indica três possibilidades para organização genômica. A primeira delas é que o gene se localiza em uma única cópia em cromossomos homólogos sendo que um dos cromossomos tem um polimorfismo como, por exemplo, uma deleção. Isso é possível visto que o *T. cruzi*, algumas vezes apresenta cromossomos homólogos com diferenças significativas entre si (Degrave *et al.*, 2001). As duas outras possibilidades indicam que o gene *TcRad51* passou por um processo de duplicação, e as duas cópias poderiam estar no mesmo cromossomo ou em cromossomo diferentes. No primeiro caso, as cópias estariam em tandem. O padrão de digestão com *EcoRI* indica a presença de três bandas tanto para Cl-Brener como para Tulahuén. Entretanto, essa enzima só corta o gene em um ponto. A terceira explicação para o padrão de bandas apresentado seria que o gene TcRad51 apresentaria duas cópias cada uma em um cromossomo diferente. Entretanto, esses cromossomos apresentariam um padrão de digestão bastante similar. Tal explicação seria a menos provável. A presença de até três alelos diferentes do gene *TcRad51* em uma mesma cepa indica que realmente o gene deve ter passado por um processo de duplicação. É interessante salientar que nos organismos estudados até o momento, inclusive o *T.*

brucei, um organismo geneticamente próximo ao *T. cruzi*, o gene *Rad51* apresenta apenas uma cópia. A duplicação verificada pode ser um evento restrito ao *T. cruzi* e pode indicar que, em algum momento evolutivo, a função exercida por *TcRad51* deve ter sido de grande importância para o desenvolvimento desse parasito. A localização cromossômica do gene *TcRad51* pode ser feita através de eletroforese de campo alternado. Isso ajudaria a se definir melhor a organização do(s) gene(s) *TcRad51* no genoma do *T. cruzi*. Foi detectado um único RNA mensageiro de cerca 1,7Kb, o qual se encontra em níveis baixos em todas as formas do parasito. A análise de densitometria das bandas indica que a expressão é maior na forma amastigota quando comparada às formas epimastigota e tripomastigota. A forma amastigota é a forma que se divide no interior das células do hospedeiro vertebrado, onde os processos metabólicos geram mais substâncias que podem interferir na estrutura da molécula de DNA. Além disso, essa forma se reproduz consideravelmente. Portanto, isso poderia explicar uma maior necessidade de expressão de proteínas envolvidas no metabolismo do DNA.

Algumas proteínas envolvidas no reparo de DNA de eucariotos são capazes de interferir no metabolismo de DNA da *E. coli* e ativar o sistema S.O.S (Perkins *et al.*, 1999). A ativação desse sistema pode gerar mutantes. E a presença desses mutantes pode ser detectada utilizando ensaios de resistência a antibióticos. Dessa forma, bactérias *E. coli* selvagens (AB1157) e *recA*⁻ (DH5- α) foram transformadas com plasmídeo pUC18 contendo ou não o gene *TcRad51* e submetidas a testes de resistência a rifampicina. Uma das funções da proteína RecA é acionar o sistema S.O.S., e, portanto, bactérias *recA*⁻ perdem a capacidade de induzir tal tipo de resposta. Assim, bactérias DH5- α apresentaram um número de mutantes inferior a 1×10^8 no teste de resistência a rifampicina. Por outro lado, bactérias AB1157 que são selvagens para esse gene apresentaram um número 10 vezes maior de mutantes quando expressando *TcRad51* se comparadas às bactérias transformadas apenas com o plasmídeo. Isso indica que o produto do gene *TcRad51* foi capaz de interferir no metabolismo de DNA da *E. coli* ativando o sistema S.O.S. Como a proteína TcRad51 possui um sítio de ligação ao DNA, ela pode se ligar a essa molécula impedindo que a sua replicação e mesmo que o reparo ocorra pelas vias normais.

A atividade funcional do gene *TcRad51* foi verificada também em *Saccharomyces cerevisiae*. Para isso, foi inativado o gene *Rad51* de uma levedura haplóide (*ScRad51*). Isso foi feito pela substituição desse gene por um cassete de histidina por recombinação homóloga. Dois iniciadores, um que se anela internamente ao cassete e outro iniciador que se anela a região externa do gene de levedura, foram utilizados numa PCR que confirmou essa substituição. A expressão da proteína codificada pelo gene *TcRad51* nessa levedura, ao invés de complementar, exerceu um efeito de dominância negativa. A levedura nocaute expressando *TcRad51* não apresentou crescimento, ao passo que levedura nocaute que não expressava esse gene apresentou crescimento normal. Uma das razões para esse fenômeno pode estar relacionada ao fato de que a levedura expressando *TcRad51* perdeu sua capacidade de reparar as quebras de dupla fita que surgem durante o processo de replicação. O produto do gene *TcRad51* se ligaria as quebras, impedindo que outras vias de reparo de quebra de fita dupla que não dependem de *ScRad51* fossem acionadas. Além disso, as regiões N-terminal da proteína codificada por *TcRad51* e por *ScRad51* são consideravelmente diferentes. Visto que essa região seria supostamente a de interação com outras proteínas, essa diferença impediria que *TcRad51* substituísse *ScRad51* em sua função. Quando a expressão do gene *TcRad51* foi feita em levedura selvagem para o gene *ScRad51*, nenhuma alteração no crescimento foi observada (dado não mostrado). Nesse caso, o produto do gene *ScRad51* compete com o produto do gene *TcRad51* pelas quebras permitindo que as leveduras efetuem o reparo de forma correta e cresçam normalmente. Os produtos dos genes *Rad51* de humanos e de *Schizosaccharomyces pombe* também não são capazes de complementar as funções de reparo do gene *ScRad51* em *Saccharomyces cerevisiae* nocauteados para o mesmo (Shinoraha *et al.*, 1993).

A clonagem de *TcRad51* permite também que se façam estudos da evolução molecular do mesmo. Obtivemos a seqüência de uma parte do gene *TcRad51* para 11 cepas de *T. cruzi*. Essa região corresponde do nucleotídeo 1 ao 359, e codifica uma seqüência menos conservada da proteína quando comparada a proteínas *Rad51* de outros organismos. Entretanto, essas seqüências são bastante semelhantes quando elas são comparadas entre as cepas desse parasito. Visto que o *T. cruzi* é um organismo de reprodução clonal, esperava-se que a divergência entre alelos de uma mesma cepa fosse maior. É bastante provável que mecanismos

de conversão gênica e recombinação estejam atuando para manutenção dessa semelhança. Tal fenômeno seria uma segunda evidência da importância biológica do produto do gene *TcRad51* para esse parasito. A árvore filogenética para as 10 cepas destaca a presença de três grupos de *T. cruzi*: um grupo é formado pelas cepas 1005, 115, 167 e 239; o segundo grupo é formado pelas cepas 115, Tuluahuén, 231, 222 e 167 e o terceiro grupo composto por D7, Colombiana e RB1. Essa divisão é diferente da divisão proposta que seria: *T. cruzi* I que compreende as cepas 222, 231, 1005, Tuluahuén, 115, 167 e 239; e *T. cruzi* II formado pelas cepas Colombiana, RB1, D7, ela é baseada em marcadores moleculares como “DNA fingerprint” (Macedo *et al.*, 1992) e RNA ribossômico (Souto *et al.*, 1996). Ainda, estudos epidemiológicos apontam para uma associação entre o *T. cruzi* I infectando espécies de triatomíneos e *T. cruzi* II infectando primatas. Além disso, alguns autores propõem a presença de dois ciclos de vida para esse parasito, um no ambiente silvestre e outro no ambiente doméstico infectando o homem. Como consequência, esses grupos estão sob processos de seleção diferentes visto que elas se adaptam a hospedeiros diferentes. Assim, a divergência genética entre elas pode ser devido a esses fatores. Duas cepas, 115 e 167, possuem alelos em dois grupos. Isso indica que essas cepas são híbridas e podem ter surgido de eventos raros de reprodução sexual entre cepas de grupos diferentes. Alternativamente, essas cepas poderiam ter mantido um caráter heterozigoto ancestral, e as outras cepas teriam perdido esse caráter devido a eventos de rearranjo gênico. Os valores de “bootstrap” foram baixos para o gene *TcRad51*. Entretanto, a análise de um fragmento de 800 pb do gene *MSH2* para essas mesmas cepas indica uma divisão similar com valores mais significativos (in press), o que apóia nossos resultados. Além disso, a análise de polimorfismos em quatro genes para várias cepas de *T. cruzi* mostrou que essas cepas se dividiam em três ou quatro grupos dependendo do gene (Machado & Ayala, 2000). As cepas, 1005 e 239, apresentam apenas um alelo seqüenciado, isso pode ser devido ao fato de ter apenas três seqüenciamentos para cada. Entretanto, como estas cepas pertencem ao mesmo grupo não se pode descartar a possibilidade delas terem um ancestral que perdeu uma das cópias do gene. Outros seqüenciamentos devem ser feitos em busca de novos alelos.

A clonagem e caracterização do gene *TcRad51* representam o início dos estudos voltados para o entendimento de processos de rearranjos gênicos em *T. cruzi*. A obtenção da proteína codificada por esse gene e estudo de suas

propriedades funcionais, assim como a manipulação deste gene no parasito poderá prover novas informações relevantes para um conhecimento mais abrangente da biologia destes organismos.

CONCLUSÕES

- A seqüência completa do gene *TcRad51* apresenta homologia com diversas recombinases de eucariotos e procariotos, sendo que a homologia é maior com *Rad51* de *T. brucei* e *Leishmania major*.
- Alinhamento entre seqüências de várias de proteínas Rad51 de diversos organismos indica uma conservação principalmente na região C-terminal da proteína. Quando apenas as proteínas de *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major* são consideradas, a conservação se estende por toda a proteína.
- A proteína TcRad51 apresenta um domínio de ligação a DNA do tipo hélice-grampo-hélice, um domínio de ligação a ATP/GTP do tipo Walker A e um motivo da superfamília das AAA-ATPases. Embora esses domínios não sejam exclusivos das recombinases, eles são necessários para a atividade desempenhada por essas proteínas.
- O gene *TcRad51* é representado por duas cópias no genoma do *T. cruzi*. Entretanto, apenas um mRNA é encontrado em todas as formas do parasito em níveis baixos. Em amastigostas, esse mRNA é duas vezes mais abundante que em epimastigotas e tripomastigotas.
- O produto do gene *TcRad51* quando presente em bactérias *E. coli* selvagens gera um aumento na taxa de mutação desse organismo como demonstrado pelos ensaios de resistência a rifampicina. Provavelmente, isso ocorre porque a proteína TcRad51 se liga ao DNA bacteriano, interferindo sobre o metabolismo dessa molécula e ativando o sistema S.O.S.
- O crescimento de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, nocautes para o gene *ScRad51*, é impedido pela expressão do gene *TcRad51*. O produto do gene de *T. cruzi* deve estar se ligando as quebras de dupla fita, mascarando-as e impendendo o seu reparo por outras vias.

- Análises de evolução molecular de dez cepas do *T. cruzi* indicam uma divisão dessas cepas em três grupos: o primeiro composto por Colombiana, D7 e RB1; o segundo, por 167, 115, 1005 e 239; e o terceiro por Tuluahuén, 115, 167, 231 e 222. Duas cepas, 115 e 167, apresentam alelos em grupos diferentes e, portanto, podem ser consideradas híbridas.

PERSPECTIVAS

- Obter a proteína TcRad51 e realizar experimentos de caracterização in vitro;
- Verificar a sensibilidade das cepas de *T. cruzi*: JG, Colombiana e CI-Brener (representantes de cada grupo encontrado na análise filogenética) após a exposição dessas a agentes genotóxicos, como a radiação ionizante.
- Promover o silenciamento do gene *TcRad51* em *T. cruzi* e verificar uma possível alteração na manutenção da baixa divergência entre alelos nesse parasita após um determinado número de gerações.

BIBLIOGRAFIA

- Aihara, H.; Ito, Y.; Kurumizaka, H.; Terada, T.; Yokoyama, S.; Shibata, T. An interaction between a specified surface of the C-terminal domain of RecA protein and double-stranded DNA for homologous pairing. *J Mol Biol*, v. 274, n. 2, p. 213-21, 1997.
- Aihara, H.; Ito, Y.; Kurumizaka, H.; Yokoyama, S.; Shibata, T. The N-terminal domain of the human Rad51 protein binds DNA: structure and a DNA binding surface as revealed by NMR. *J Mol Biol*, v.290, n. 2, p. 495-504, 1999.
- Akhavan.; D. Análise custo-efetividade do programa de controle da doença de Chagas no Brasil (Relatório final). Fundação Nacional de Saúde/Programa das Nações Unidas para o desenvolvimento, 1996.
- Anderson, C. W.; Carter, T. H. The DNA-activated protein kinase - DNA-PK. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 217, p. 91-111, 1996.
- Aravind, L.; Walker, D. R.; Koonin E. V. Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res*, v. 27, n. 5, p. 1223-42, 1999
- Augusto-Pinto, L.; Bartholomeu, D. C.; Teixeira, S. M.; Pena, S. D.; Machado, C. R. 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, 2001.
- Bachmann, B. J. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev*, v. 36, n. 4, p. 525-57, 1972.
- Bashkirov, V. I.; King, J. S.; Bashkirova, E. V.; Schmuckli-Maurer, J.; Heyer, W.D. DNA repair protein Rad55 is a terminal substrate of the DNA damage checkpoints. *Mol Cell Biol*, v. 20, n. 12, p. 4393-404, 2000.
- Baumann, P.; West, S. C. DNA end-joining catalyzed by human cell-free extracts. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 95, n. 24, p. 14066-70, 1998.
- Birky, C. W. Jr. Heterozygosity, heteromorphy and phylogenetic trees in asexual eukaryotes. *Genetic*, v. 144, n. 1, p. 427-37, 1996.
- Boulton, S. J.; Jackson, S. P. Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J*, v. 17, n. 6, p. 1819-28, 1998.
- Brachmann, C. B.; Davies, A.; Cost, G. J.; Caputo, E.; Li, J.; Hieter, P.; Boeke J. D. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a

- useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, v. 14, n. 2, p. 115-32, 1998.
- Briones, M. R.; Souto, R. P.; Stolf, B. S.; Zingales, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol*, v. 104, n. 2, p. 219-32, 2001.
- Critchlow, S. E.; Bowater, R. P.; Jackson, S. P. Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol*, v. 7, n. 8 p. 588-98, 1997.
- Davis, A. P.; Symington, L. S. The yeast recombinational repair protein Rad59 interacts with Rad52 and stimulates single-strand annealing. *Genetics*, v. 159, n. 2, p. 515-25, 2001.
- Degrave, W. M.; Melville, S.; Ivens, A.; Aslett, M. Parasite genome initiatives. *Int J Parasitol*, v. 31, n. 5-6, p. 532-6, 2001.
- Dias, J. C. P. Epidemiology of Chagas disease. In: Wendel, S.; Nreene, Z.; Camargo, M.; Rassu, A. Chagas Disease (American Trypanosomiasis): It's impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo ISTB Brazil –SBHH.; p. 49-80, 1992
- Farez-Vidal, M. E.; Gallego, C.; Ruiz-Perez, L. M.; Gonzalez-Pacanowska, D. Characterization of uracil-DNA glycosylase activity from *Trypanosoma cruzi* and its stimulation by AP endonuclease. *Nucleic Acids Res*, v. 29, n. 7, p. 1549-55, 2001.
- Felsenstein, J. <<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>> Department of Genetics.; University of Washington.; Seattle.
- Gietz, D.; St Jean, A.; Woods, R. A.; Schiestl, R. H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*, v. 20, n. 6, p. 1425, 1992.
- Grossmann, K. F.; Ward, A. M.; Matkovic, M. E.; Folias, A. E.; Moses, R. E. S. *cerevisiae* has three pathways for DNA interstrand crosslink repair. *Mutat Res*, v. 487, n. 3-4, p. 73-83, 2001.
- Gupta, R. C.; Bazemore, L. R.; Golub, E. I.; Radding, C. M. Activities of human recombination protein Rad51. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 94, n. 2, p. 463-8, 1997.

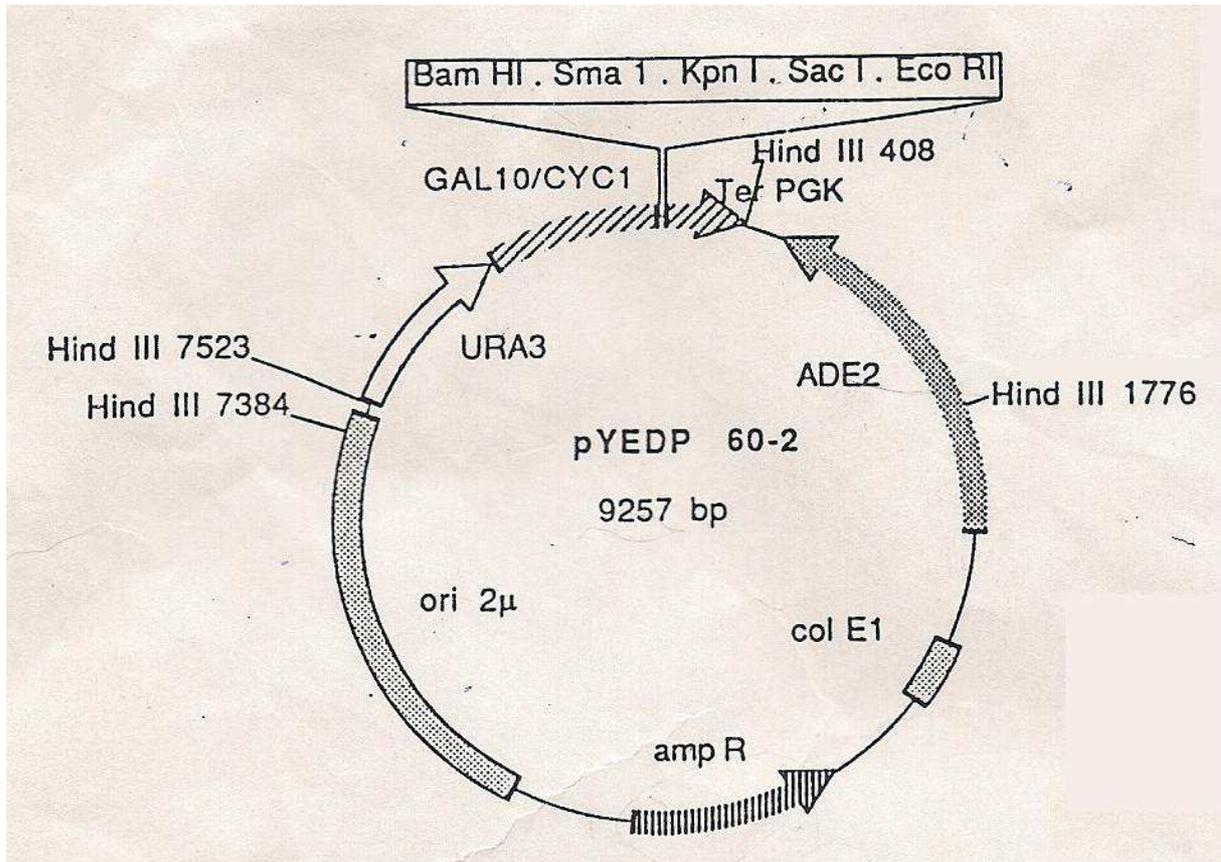
- Gupta, R. C.; Golub, E.; Bi, B.; Radding, C. M. The synaptic activity of HsDmc1.; a human recombination protein specific to meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 98, n. 15, p. 8433-9, 2001.
- Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, v. 166, n. 4, p. 557-80, 1983.
- Hotta, Y.; Furukawa, K.; Tabata, S. Meiosis specific transcription and functional proteins. *Adv Biophys*, v. 31, p. 101-15, 1995.
- Ivanov, E. L.; Haber, J. E. DNA repair: RAD alert. *Curr Biol*. v. 7, n. 8, p. 492-5, 1997.
- Jeggo, P. A. DNA-PK: at the cross-roads of biochemistry and genetics. *Mutat Res*, v. 384, n. 1, p. 1-14, 1997.
- Kanaar, R.; Hoeijmakers, J. H.; van Gent, D. C. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol*, v. 8, n. 12, p. 483-9, 1998.
- Kowalczykowski, S. C.; Dixon, D. A.; Eggleston, A. K.; Lauder, S. D.; Rehrauer W. M. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, v. 58, n. 3, p. 401-65, 1994.
- Kurumizaka, H.; Aihara, H.; Ikawa, S.; Kashima, T.; Bazemore, L. R.; Kawasaki, K.; Sarai, A.; Radding, C. M.; Shibata, T. A possible role of the C-terminal domain of the RecA protein. A gateway model for double-stranded DNA binding. *J Biol Chem*, v. 271, n. 52, p. 33515-24, 1996.
- Kuzminov, A. DNA replication meets genetic exchange: chromosomal damage and its repair by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 98, n. 15, p. 8461-8, 2001a.
- Kuzminov, A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 98, n. 15, p. 8241-6, 2001b.
- Lea, D. E.; Coulson, C. A. The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *J Genet*, v. 9, n. 3. p. 264-85, 1949.
- Lehninger, A. L. Principles of Biochemistry. 3ª Edição, Worth Publishers, 2001.
- Liang, F.; Jasin, M. Ku80-deficient cells exhibit excess degradation of extrachromosomal DNA. *J Biol Chem*, v. 271, n. 24, p. 14405-11, 1996.
- Lim, D. S.; Hasty, P. A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol Cell Biol*, v. 16, n. 12 p. 7133-43, 1996.

- Macedo, A. M.; Martins, M. S.; Chiari, E.; Pena, S. D. *Mol Biochem Parasitol*, v. 55, p. 147-153, 1992.
- Machado, C. A.; Ayala, F. J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 98, n. 13, p. 7396-401, 2001.
- McCulloch, R.; Barry, J. D. A role for RAD51 and homologous recombination in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Genes Dev*, v. 13, n. 21, p. 2875-88, 1999.
- Milei, J.; Mautner, B.; Storino, R.; Sanchez J. A.; Ferrans, V. J. Does Chagas' disease exist as an undiagnosed form of cardiomyopathy in the United States? *Am Heart J*, v. 123, n. 6, p. 1732-5, 1992.
- Momen, H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94, supl. 1, p. 181-4, 1999.
- Mortensen, U. H.; Bendixen, C.; Sunjevaric, I.; Rothstein, R. DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 93, n. 20, p. 10729-34, 1996.
- New, J. H.; Sugiyama, T.; Zaitseva, E.; Kowalczykowski, S. C. Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* v. 391, n. 6665, p. 407-10, 1998.
- Ogawa, H.; Johzuka, K.; Nakagawa, T.; Leem, S. H.; Hagihara, A. H. Functions of the yeast meiotic recombination genes, MRE11 and MRE2. *Adv Biophys* v. 31, p. 67-76, 1995.
- Paull, T. T.; Gellert, M. The 3' to 5' exonuclease activity of Mre11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell*, v. 1, n. 7, p. 969-79, 1998.
- Pereira, M. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. In: Wyler DJ (ed) *Modern Parasite Biology – Cellular, Immunological and Molecular Aspects*. W.H. Freeman and Company.; New York pp 428, 1990.
- Perez, J.; Gallego, C.; Bernier-Villamor, V.; Camacho, A.; Gonzalez-Pacanowska, D.; Ruiz-Perez, L. M. Apurinic/aprimidinic endonuclease genes from the trypanosomatidae *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, v. 27, n. 3, p. 771-7, 1999.

- Perkins, E. L.; Sterling, J. F.; Hashem, V.I.; Resnick, M. A. Yeast and human genes that affect the *Escherichia coli* SOS response. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 96, n. 5, p. 2204-9, 1999.
- Raderschall, E.; Stout, K.; Freier, S.; Suckow, V.; Schweiger, S.; Haaf, T. Elevated levels of rad51 recombination protein in tumor cells. *Cancer Res*, v. 62, n. 1, p. 219-25, 2002.
- Ramsden, D. A.; Gellert, M. Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks. *EMBO J*, v. 17, n. 2, p. 609-14, 1998.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor, v.1-3, 1998.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminator inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 74, n. 12, p. 5463-67, 1977.
- Schmuñiz, G. A. A Tripanosomiase Americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: Brener.; Z.; Andrade.; Z. & Barral-Neo.; M. Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas, Rio de Janeiro, 2a edição, Guanabara Koogan, 2000.
- Shinohara, A.; Ogawa, H.; Matsuda, Y.; Ushio, N.; Ieko, K.; Ogawa, T. Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. *Nat Genet*, v. 4, n. 3, p. 239-43, 1993.
- Sibanda, B. L.; Critchlow, S. E.; Begun, J.; Pei, X. Y.; Jackson, S. P.; Blundell, T. L.; Pellegrini, L. Crystal structure of an Xrcc4-DNA ligase IV complex. *Nat Struct Biol*, v. 8, n. 12, p. 1015-9, 2001.
- Silveira, A. C.; Rezende, F. D. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med Trop*, supl. III, p. 11-22, 1994
- Skolnick, A. Does influx from endemic areas mean more transfusion-associated Chagas' disease? *JAMA*, v. 262, n. 11, p. 1433, 1989.
- Solinger, J. A.; Heyer, W. D. Rad54 protein stimulates the postsynaptic phase of Rad51 protein-mediated DNA strand exchange. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 98, n. 15, p. 8447-53, 2001.
- Sonoda, E.; Sasaki, M. S.; Buerstedde, J. M.; Bezzubova, O.; Shinohara, A.; Ogawa, H.; Takata, M.; Yamaguchi-Iwai, Y.; Takeda, S. Rad51-deficient

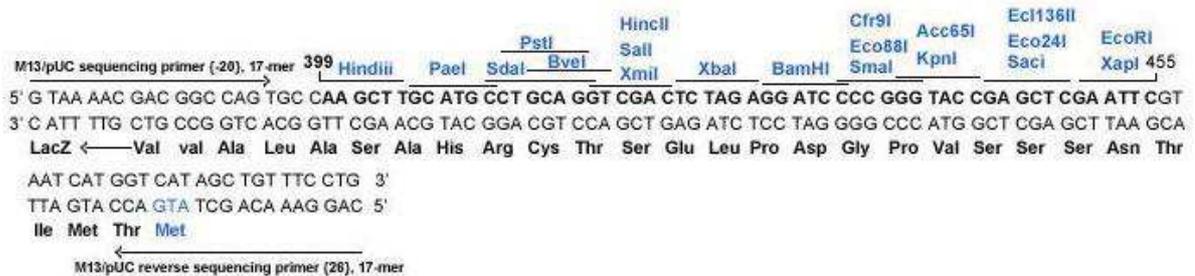
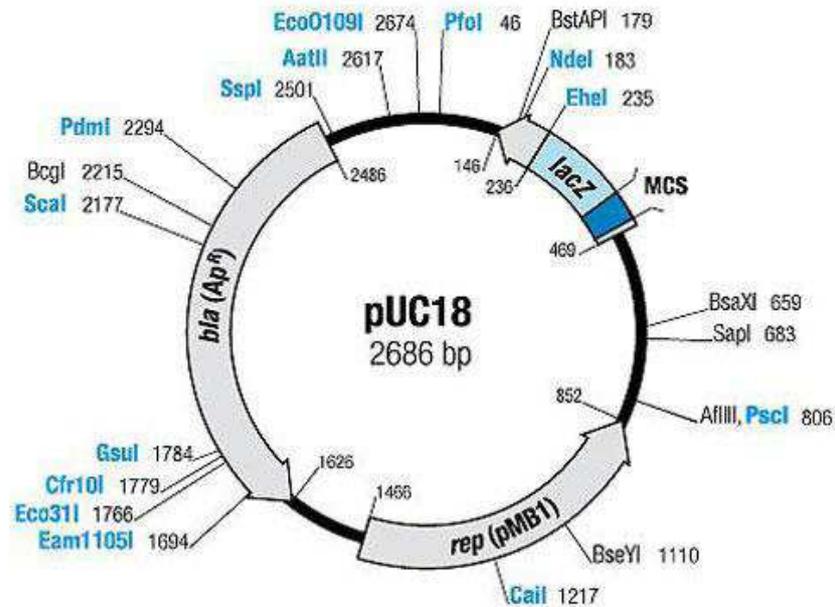
- vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J*, v. 17, n. 2, p. 598-608, 1998.
- Souto, R. P.; Fernandes, O.; Macedo, A. M.; Campbell, D. A.; Zingales, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, v. 83, n. 2, p 141-152.
- Sung, P. Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. *Genes Dev*, v. 11, n. 9, p. 1111-21, 1997.
- Teixeira, S. M.; Russell, D. G.; Kirchhoff, L. V. ; Donelson J. E. A differentially expressed gene family encoding "amastin.;" a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *J Biol Chem*, v. 269, n. 32, p. 20509-16, 1994.
- Teixeira, S. M. Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz J Med Biol Res*, v. 31, n. 12, p. 1503-16, 1998.
- Tsukamoto, Y.; Kato, J.; Ikeda, H. Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, v. 388, n. 6645, p. 900-3, 1997.
- Tsuzuki, T.; Fujii, Y.; Sakumi, K.; Tominaga, Y.; Nakao, K.; Sekiguchi, M.; Matsushiro, A.; Yoshimura, Y.; Morita, T. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 93, n. 13, p. 6236-40, 1996.
- WHO Control of Chagas' disease. Report of a WHO Expert Committee, Geneva, *WHO Technical Report Series*, v. 811 n. 95, 1991

Anexos



Ori	-	Origem de replicação
ampR	-	Gene que codifica a β -lactamase
col E1	-	Região do plasmídeo Col E1
GAL10/CYC	-	Gene que codifica a UDP-galactose epimerase
URA3	-	Gene que codifica a Orotidine 5-fosfato descarboxilase
ADE2	-	Gene que codifica a Fosforribosil aminoimidazol carboxilase

Mapa esquemático do plasmídeo pYeDP



- Bla (ApR) - Gene que codifica a β -lactamase
 LacZ - Gene que codifica a β -galactosidase
 rep(pMB1) - Região do plasmídeo pMB1

Mapa esquemático do plasmídeo pUC18