



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

METABOLISMO DE DNA EM *TRYPANOSOMA CRUZI*:
CARACTERIZAÇÃO DOS GENES *RAD51* E *DNA*
POLIMERASE β

CARLOS GUSTAVO REGIS DA SILVA

SETEMBRO/2006

CARLOS GUSTAVO REGIS DA SILVA

**METABOLISMO DE DNA EM *TRYPANOSOMA CRUZI*:
CARACTERIZAÇÃO DOS GENES *RAD51* E *DNA*
*POLIMERASE β***

**TESE SUBMETIDA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
IMUNOLOGIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE MINAS GERAIS COMO
REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS:
BIOQUÍMICA.**

**ORIENTADOR: CARLOS RENATO MACHADO
CO-ORIENTADORA: SANTUZA M. R. TEIXEIRA**

SETEMBRO/2006

043 Silva, Carlos Gustavo Regis da.

Metabolismo de DNA em *Trypanosoma cruzi* : caracterização dos genes RAD51 e DNA polimerase β [manuscrito] / Carlos Gustavo Regis da Silva. - 2006.

161 f.: il. ; 29,5 cm.

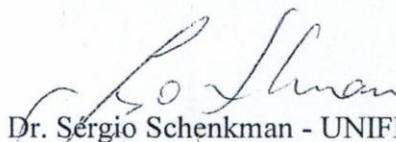
Orientador: Carlos Renato Machado. Co-orientadora: Santuza M. R. Teixeira.

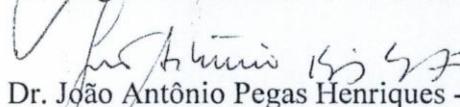
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

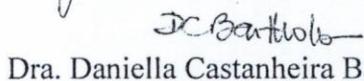
1. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 2. Reparo do DNA - Teses. 3. DNA polimerases - Teses. 4. RAD51 recombinase. 5. Bioquímica - Teses. I. Machado, Carlos Renato. II. Teixeira, Santuza Maria Ribeiro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.



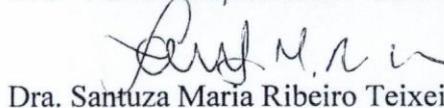
ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE CARLOS GUSTAVO REGIS DA SILVA. Ao primeiro dia do mês de setembro de 2006 às 13:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da tese de doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Metabolismo de DNA em *Trypanosoma cruzi*: Caracterização dos Genes RAD51 e DNA Polimerase" requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. 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 arguição 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: Dr. Sérgio Schenkman da Universidade Federal de São Paulo, aprovado; Dr. João Antônio Pegas Henriques da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, aprovado; Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dra. Vânia Ferreira Prado 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, aprovado. 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, 1º de setembro de 2006.


Dr. Sérgio Schenkman - UNIFESP

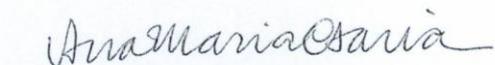

Dr. João Antônio Pegas Henriques - UFRGS


Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu - UFMG


Dra. Vânia Ferreira Prado - UFMG


Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira-co-orientadora - UFMG


Dr. Carlos Renato Machado - orientador - UFMG


Prof. Ana Maria Coetano de Faria
Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em
Bioquímica e Imunologia - Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

LOCAIS DE EXECUÇÃO

**LABORATÓRIO DE GENÉTICA-BIOQUÍMICA E
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA E BIOLOGIA CELULAR DE PARASITOS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – UFMG
BELO HORIZONTE, BRASIL**

**GROUP DE INSTABILITE GENETIQUE ET CANCER
DEPARTEMENT DE "MECANISMES DE SURVEILLANCE DU GENOME"
INSTITUT DE PHARMACOLOGIE ET BIOLOGIE STRUCTURALE
TOULOUSE, FRANÇA**

**“ANY FOOL CAN MAKE THINGS BIGGER,
MORE COMPLEX, AND MORE VIOLENT. IT
TAKES A TOUCH OF GENIUS - AND A LOT OF
COURAGE - TO MOVE IN THE OPPOSITE
DIRECTION.”**

ALBERT EINSTEIN

**DEDICO ESTE TRABALHO AOS MEUS PAIS E À
MINHA IRMÃ. OS ÚNICOS QUE
COMPREENDEM COMPLETAMENTE SUA
IMPORTÂNCIA.**

Meus mais sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador Dr. Carlos Renato pela paciência e persistência. O seu otimismo e curiosidade científica foram os grandes alicerces desse trabalho. Agradeço-o por investir seu tempo em minha formação profissional.

À minha co-orientadora Dra. Santuza por compartilhar seus conhecimentos e pela atenção. Suas sugestões contribuíram muito para a realização desse trabalho. Sua postura como cientista é inspiradora.

Ao Dr. Sérgio Pena, à Dra. Glória Franco e à Dra. Andrea Macedo pelas sugestões, críticas e rigor científico, que mantêm a qualidade dos trabalhos produzidos no Laboratório de Genética-Bioquímica.

Aos alunos Jorge e Danielle, ao Dr. Luiz Augusto e ao Dr. Wanderson que participaram tecnicamente desse trabalho. Foram fundamentais para que juntos alcançássemos algo maior. Agradeço-lhes também a amizade.

Às técnicas Neuza, Miriam, Kátia e Rúbia que viabilizam a execução de todos os trabalhos do laboratório. Ao técnico Elimar deste departamento que também contribuiu para este trabalho.

Ao Dr. Alfredo Góes que ajudou na produção dos anticorpos.

À Celise que sempre me ajudou a resolver meus problemas burocráticos.

Às agências financiadoras: CNPq, CAPES, COFECUB, FAPEMIG e Howard Hughes Medical Institute.

A todos os alunos e ex-alunos do Laboratório de Genética-Bioquímica (Simone Pires, Simone Santos, Débora Naves, Marina, Marcela, Pedro Henrique, Alessandra, Alessandra Campos, Fernanda, Vanessa, Fernanda Moratelli, Francisco Lobo, Luciana, Michael, Antônio, Rogério, Lucas, Claudiney e todos os outros que se tornaram doutores e mestres) pela convivência e amizade.

À Fernanda Moratelli, pela convivência e por ter produzido a capa da minha dissertação.

À Dra. Maria de Fátima e a todos os alunos e ex-alunos do Laboratório de Imunologia e Biologia Celular de Parasitos (Daniela, Priscila, Camila, Fabiano, Jarina, Vinício, Patrícia, Thiago, Sophie) pela convivência e por me receberem tão bem em seu laboratório. Em especial, à Dra. Rosiane, à Dra. Júnia, à Dra. Daniela Bartholomeu e à Dra. Jane que sempre mostraram disposição para me ajudar. À Luciana Werneck pela amizade.

Ao Dr. Christophe Cazaux, ao Dr. Jean-Sebastien Hoffmann e a todos do grupo de “Instabilité Génétique et Cancer” pela ajuda e pela convivência em seu laboratório. Em especial, à Dra. Clarisse Bavoux e à Dra. Marie-Jeanne Pillaire.

Às meninas do grupo de reparo de DNA: Alice, Danielle, Débora e Michelle, pelo trabalho em equipe, pela amizade e pelas risadas.

Aos meninos do grupo de reparo de DNA: Bruno, Carlos, João Pedro e Matheus pela convivência. Em especial, a João Pedro e Matheus por me ensinarem a ensinar e a Bruno por continuar o meu trabalho.

A todos do Departamento de Bioquímica e Imunologia que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho. Em especial, a Jamil.

Aos meus amigos: Rodrigo, Carla, Ângelo, André, Cristiane, Renata, Juliane Alves e Juliane Guimarães. Fomos separados pela distância, mas nos mantemos unidos pelos bons sentimentos.

À Raquel pelos sorrisos que sempre me trazem alegria e pela conversa sempre alegre que me traz esperança.

À Claudinha que se tornou uma grande amiga no momento em que eu mais precisava.

À Carol pelo carinho, apoio, cumplicidade e confiança. Te amodoro!

Ao Helder pelos anos de convivência, pelas brincadeiras, por me fazer rir, pela oportunidade de conhecê-lo, por estar disposto a me ouvir, por me compreender, enfim, por ser meu amigo.

Ao Charles pelas confidências, por compartilhar seus pensamentos, por agir como um irmão mesmo sem haver nenhum grau de parentesco, por me mostrar minhas qualidades, por me perdoar pelos meus defeitos, por pensar em mim como um amigo.

Aos meus pais e à minha irmã pelo apoio durante todos esses anos, por se preocuparem comigo e, sobretudo, pelo amor.

Índice de Figuras e Tabelas	XI
Abreviaturas	XIV
Resumo	XV
Abstract	XVII
1. Introdução	18
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
1.2. Variabilidade genética nas populações de <i>T. cruzi</i>	21
1.3. Reparo de DNA em <i>T. cruzi</i>	22
1.4. Reparo por recombinação homóloga	24
1.5. As proteínas Rad51 e RecA	28
1.6. Rad51 e Recombinação em Tripanossomatídeos	29
1.7. A proteína Rad51 de <i>T. cruzi</i>	32
1.8. Reparo por Excisão de Base	33
1.9. DNA polimerase β (DNA pol β) e Reparo por Excisão de Base	34
1.10. DNA pol β em Tripanossomatídeos	36
1.11. Como proteínas envolvidas na manutenção da estabilidade genômica poderiam gerar variabilidade genética?	38
2. Objetivos	40
2.1. Objetivo Geral	41
2.2. Objetivos Específicos	41
3. Material e Métodos	43
3.1. Meio de cultura e linhagens de bactérias e células eucarióticas	44
3.2. PCR e clonagens	44
3.3. Transformação de <i>E. coli</i> competentes	47
3.4. Extração de plasmídeos pela técnica de “minipep” e “midiprep”	47
3.5. Reações de sequenciamento	48
3.6. Eletroforese em campo pulsátil (PFGE)	49
3.7. Extração de RNA total de <i>T. cruzi</i>	50
3.8. "Northern blot"	50
3.9. Marcação de sondas com ^{32}P e purificação da sonda radioativa	51
3.10. Expressão e purificação da DNA pol β em <i>E. coli</i>	52
3.11. Ensaio de complementação funcional em bactéria	52

3.12.	Ensaio de recombinação em células eucarióticas	53
3.13.	Ensaio <i>in vitro</i> de síntese de DNA	53
3.14.	Ensaio <i>in vitro</i> da incorporação de AZT	55
3.15.	Extratos totais, nucleares e citoplasmáticos	55
3.16.	“Western Blot”	56
3.17.	RT-PCR em tempo real	57
3.18.	Sobrevivência de cepas do <i>T. cruzi</i> na presença de AZT	57
3.19.	Sobrevivência e crescimento de cepas do <i>T. cruzi</i> após irradiação γ	58
4.	Resultados	59
4.1.	Ensaio de Recombinação em CHO utilizando o gene <i>Rad51</i>	60
4.2.	Resposta do <i>Trypanosoma cruzi</i> frente à irradiação γ	62
4.3.	Clonagem do gene da DNA pol β do <i>T. cruzi</i>	66
4.4.	Expressão da TcDNA pol β em <i>E. coli</i>	72
4.5.	Expressão da TcDNA pol β em epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	72
4.6.	Complementação funcional da bactéria SC18-12	75
4.7.	Síntese <i>in vitro</i> de DNA	77
4.8.	Incorporação de AZT <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	77
4.9.	Caracterização das condições ótimas de atividade da TcDNA pol β	80
4.10.	Fidelidade da síntese da TcDNA pol β <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	88
4.11	Incorporação de didesoxinucleotídeos na molécula de DNA pela TcDNA pol β	92
5.	Discussão	97
6	Bibliografia	115
7	Anexo I – Mapas dos Plasmídeos	131
8	Anexo II – Publicações	136

Lista de Figuras

1	Ilustração esquemática do processo de recombinação e reparo de quebra de dupla fita.	25
2	Ilustração esquemática do processo de troca entre fitas simples e dupla de DNA promovidas pela proteína RecA.	27
3	Comparação entre as proteínas Rad51 humana (HsRad51) e RecA de <i>E. coli</i> .	30
4	Ilustração esquemática do reparo por excisão de base.	35
5	Ensaio de recombinação em células CHO DRA10 K1 transformadas com o vetor pcDNA3 e esse mesmo vetor carregando o gene <i>TcRad51</i> .	61
6	Curva de sobrevivência à radiação ionizante.	63
7	Northern blot utilizando como sonda o gene <i>TcRad51</i> .	64
8	Resposta do <i>T. cruzi</i> frente à radiação γ . Gel de Agarose LMP 1% onde foram resolvidas, por PFGE, amostras da cepa CL-Brener obtidas vários tempos após a irradiação.	65
9	Análise do padrão de bandas cromossômicas de <i>T. cruzi</i> em diferentes tempos após exposição à radiação γ	67
10	Curva de crescimento da cepa CL Brener de <i>T. cruzi</i> .	68
11	Alinhamento das seqüências das proteínas DNA pol β de <i>Trypanosoma cruzi</i> (Tc), <i>Rattus norvegicus</i> (Rn) e <i>Homo sapiens</i> (Hs).	70
12	Alinhamento das seqüências das proteínas DNA pol β de tripanossomatídeos.	71
13	(A) Expressão da proteína de fusão MBP-TcDNA pol β em <i>E. coli</i> . (B) Purificação em coluna de amilos da proteína de fusão MBP-TcDNA pol β .	73
14	Western blot de extratos da cepa CL-Brener de <i>T. cruzi</i>	74
15	Complementação da cepa SC18-12 de <i>E. coli</i> .	76
16	Síntese <i>in vitro</i> de DNA pela TcDNA pol β em fusão com MBP.	78
17	Percentual de incorporação de $^3\text{H-dTTP}$ em presença de diferentes concentrações de AZT.	79

18	Crescimento do <i>T. cruzi</i> na presença de AZTMP.	81
19	Fluorograma das reações de síntese.	82
20	(A) Atividade relativa da TcDNA pol β em diferentes concentrações de NaCl.	
	(B) Atividade relativa da TcDNA pol β em diferentes concentrações de $MgCl_2$.	84
21	Atividade relativa da TcDNA pol β em diferentes pH.	85
22	Atividade relativa da TcDNA pol β em diferentes temperaturas.	86
23	Atividade relativa da TcDNA pol β em diferentes concentrações de dNTPs.	87
24	Atividade relativa da TcDNA pol β em diferentes tempos.	89
25	Síntese de DNA pela DNA pol β com diferentes oligonucleotídeos como molde.	90
26	Síntese de DNA da DNA pol β com o oligonucleotídeo sintM138HG.	91
27	Fluorograma das reações de síntese da DNA pol β com o oligonucleotídeo pT.	93
28	Fluorograma das reações de síntese da DNA pol β com o oligonucleotídeo pA2T como molde.	94
29	Fluorograma das reações de síntese da DNA pol β com o oligonucleotídeo pT como molde.	95
30	Fluorograma das reações de síntese da TcDNA pol β com o oligonucleotídeo pA2T como molde.	96

Lista de Tabelas

I	Características genotípicas das cepas de <i>E. coli</i> AB1157, DH5- α e SC12-17	45
II	Lista de indicadores	45
III	Lista de indicadores para ensaio de síntese	54
IV	Lista de DNA polimerases e suas famílias	103

AZT	Azidotimidina
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil
BER	Do Inglês, Base excision repair
COII	Citocromo oxigenase II
DL ₅₀	Dose letal para 50% da população
dRP	Desoxirribose fosfato
DTT	Ditiotreitol
EST	Do inglês, Expressed Sequence Tags
Gy	Gray
IPTG	Isopropil-beta-D-thiogalactopiranosídeo
MBP	Do inglês, Maltose Binding Protein
MLEE	Do inglês, Multi-locus Enzyme
MMR	Do inglês, Mismatch Repair
NBT	Nitro blue tetrazolium
pb	Pares de bases
PBS	Do ingles, Phosphate Buffered Saline
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	Eletroforese em campo pulsátil
RAPD	Do inglês, Randomly Amplified Polymorphic DNA
REP	Reparo por Erro de Pareamento
RFLP	Do inglês, Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS	Sulfato dodecil de Sódio
SNP	Do inglês, Single Nucleotide Polymorphism
TBE	Tris borato EDTA
U.V.	Ultravioleta
AP	Apurínico/Apirimidínico

O *Trypanosoma cruzi* é um parasito da ordem *Kinetoplastida*, endêmico da América Latina sendo um grave problema social por causar uma doença debilitante, a doença de Chagas. Um aspecto interessante de sua biologia é a estrutura populacional composta por cepas com características muito diferenciadas. Uma grande contribuição para o entendimento da estrutura populacional desse organismo vem do projeto genoma da cepa CL Brener de *T. cruzi*. A descrição desse genoma mostra que ele é altamente complexo, rico em repetições e com muitas famílias gênicas. Entretanto, pouco se conhece a respeito da manutenção desse genoma e poucos genes envolvidos no metabolismo do DNA foram caracterizados. Nesse trabalho, pretendemos contribuir para o entendimento da forma como esse parasito garante a integridade de seu material genético. Para isso, dois genes chaves no processo de manutenção do genoma foram estudados. O primeiro deles, chamado Rad51, é conhecido em outros eucariotos por seu envolvimento no processo de recombinação. O alto grau de conservação desse gene entre os eucariotos permite que o gene *Rad51* do *T. cruzi* interfira na recombinação de células eucarióticas causando um aumento na taxa desse processo. Além disso, ele pode ser associado à resposta do *Trypanosoma cruzi* frente a lesões no DNA causadas pela radiação γ uma vez que a exposição à mesma provoca um aumento no nível de mRNA desse gene. Isso pode estar relacionado também a alta taxa de sobrevivência desse parasito e a reconstituição de seus cromossomos após tal tratamento. O segundo gene codifica para a DNA polimerase β , uma enzima que participa do reparo por excisão de base e possui capacidade de realizar síntese diante de alguns tipos de lesão. O produto desse gene em fusão com a MBP é capaz de exercer a função da DNA polimerase I em bactérias deficientes nessa proteína. Nesse mesmo sistema, ele também é capaz de realizar síntese translesão. A habilidade de síntese foi confirmada *in vitro* utilizando a proteína de fusão MBP-DNA pol β . Essa proteína teve também sua atividade enzimática testada sob diferentes condições permitindo assim a caracterização de suas condições ótimas de funcionamento. Foi possível notar que a DNA pol β é capaz de inserir nucleotídeos como azidotimina (AZT) trifosfato e didesoxirribonucleotídeos trifosfato no DNA, uma característica típica de polimerases da família X. O AZT também causa a morte de *T. cruzi* e a DNA pol β pode ser uma das enzimas responsáveis por isso. Uma outra característica dessa enzima é a sua baixa fidelidade durante o processo de síntese que pode ser um mecanismo de geração de mutações. Esse trabalho inicia um longo caminho na definição do papel da DNA polimerase β e Rad51 no metabolismo de DNA do *Trypanosoma cruzi*. Nesse trabalho, foram

caracterizados os genes *Rad51* e da DNA pol β contribuindo para melhor entender seus papéis no metabolismo de DNA.

Trypanosoma cruzi is a parasite of the *Kinetoplastida* order, endemic in Latin America, where it causes Chagas disease in humans. An interesting aspect of its biology is its population structure, composed of strains with highly differential features. The *T. cruzi* genome is highly complex, rich in repetitive elements and containing a large number of multi-copy gene families. However, little is known about the mechanisms involved in the maintenance of such a complex genome and only few genes involved in DNA metabolism in this parasite have been characterized. Our work was intended to contribute to the understanding of this important aspect of the parasite biology, *i.e.*, how genetic variability is created and, at the same time, how the integrity of the parasite's genetic material is preserved. Two key genes involved with those processes were studied: *Rad51*, because of its crucial role in DNA recombination and *DNA polymerase β* , which codes an enzyme of base excision repair. We have shown that *T. cruzi* Rad51 gene interferes with the recombination machinery of eukaryotic cells, causing an increase in the rate of these events in a mammalian cell line transfected with the *T. cruzi* gene. Furthermore, the Rad51 gene can be associated with the *T. cruzi* response to DNA lesions caused by γ radiation because exposition to this agent provokes an increase in Rad51 mRNA levels. The *T. cruzi* gene encoding DNA polymerase β is able to complement bacteria cells deficient in DNA polymerase I when expressed as a fusion with the MBP gene. It is also able to perform *in vivo* translesion synthesis in these bacteria. The DNA synthesis capability of the recombinant protein was confirmed *in vitro* using the MBP-DNA pol β protein fusion, and it was shown to present a characteristic low fidelity synthesis. Using a non-radioactive assay developed by us, we tested the DNA pol β enzymatic activity under different conditions. It was also possible to verify that the recombinant TcDNA pol β is able to insert modified nucleotides such as azidothymine (AZT) triphosphate and dideoxynucleotide triphosphate in DNA, which is an enzymatic activity characteristic of the polymerase X family. Because treatment of *T. cruzi* epimastigote cultures with AZT results in parasite death, we inferred that TcDNA pol β may be one of the enzymes responsible for incorporating this drug into the parasite's genome. Here, we have characterized the Rad51 and DNA pol β genes of *T. cruzi* contributing to better understand their roles in its DNA metabolism.

1. Introdução

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário pertencente à família tripanossomatídea e é o causador da doença de Chagas descrita em 1909 pelo médico Carlos Chagas. Desde a descoberta desse parasito, é notória a existência de várias cepas com diferentes características morfológicas e biológicas. Devido a essas diferenças, faz-se necessário agrupar essas cepas de forma a identificar padrões biológicos que permitam uma correlação com variantes da doença bem como a definição de um melhor prognóstico. Atualmente, marcadores biológicos têm sido usados para classificar essas cepas em *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, sendo que a complexidade desses marcadores em algumas cepas ainda não permitiu que elas fossem incluídas nesses grupos ou mesmo em um terceiro grupo. Recentemente, Freitas e colaboradores (2006) sugeriram o agrupamento dessas cepas baseadas no fato delas possuírem o mesmo tipo de DNA mitocondrial para a enzima citocromo oxidase II (COII), criando-se um novo grupo: *T. cruzi* III. Muitos dos marcadores descritos são genéticos ou tem profundas bases genéticas. Entretanto, os mecanismos relacionados à geração dessa diversidade genética não foram esclarecidos e muitos aspectos básicos do metabolismo de DNA desse parasito são completamente desconhecidos. O estudo das peculiaridades da replicação, reparo e recombinação do DNA em *T. cruzi*, além de oferecer respostas com relação à variedade genética das cepas, permite também a definição de futuros alvos para medicamentos, uma vez que essas vias podem ser essenciais para a sobrevivência do parasito em seus hospedeiros.

1.1. *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário da ordem Kinetoplastida e apresenta, em seu ciclo de vida, dois hospedeiros distintos: insetos reduvídeos hematófagos da subfamília Triatominae e diferentes mamíferos incluindo o homem no qual provoca a doença de Chagas. Três variações morfológicas desse parasito podem ser observadas durante o seu ciclo: epimastigota, tripomastigota e amastigota.

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 do 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 por Pereira, 1990; De Souza, 2002).

A infecção do homem pelo *T. cruzi* se caracteriza inicialmente por uma alta parasitemia culminando com a disseminação do protozoário em diversos tecidos. Durante a fase aguda, ocorre febre de moderada a severa e, ocasionalmente, essa fase é fatal em crianças. Um terceiro estágio, denominado de crônico, observa-se cardiomegalia, ou seja, aumento do volume do coração. Nesse estágio, podem ainda ocorrer aumento de órgãos como o cólon (megacólon) e esôfago (megaesôfago). Entretanto, muitos dos pacientes chagásicos são assintomáticos.

A principal área endêmica do mundo é a América Latina. Segundo a Organização Mundial de Saúde, entre 16 e 18 milhões de pessoas encontram-se infectadas sendo que 120 milhões de pessoas estão vivendo sob risco (<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas>, em 2006). Estimava-se que a população brasileira exposta ao risco de infecção é da ordem de 60 milhões (Silveira e Rezende, 1994). A doença de Chagas é um grave problema social, por se tratar de uma enfermidade crônica debilitante, representando entre as patologias tropicais a que gerou o maior ônus econômico segundo o Banco Mundial (Schmuñiz, 2000). Atualmente, estima-se que o número de mortes causadas pela doença de Chagas é de 13.000 por ano (<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/diseaseinfo.htm>, em 2006). O número de novos casos foi reduzido drasticamente devido ao controle da população de

insetos transmissores e também à melhoria das habitações em locais de riscos. Entretanto, essa doença é enzoótica e não pode ser incluída na lista de doenças erradicáveis uma vez que o ciclo biológico se mantém no ambiente silvestre. Atualmente, os casos de transmissões são principalmente congênitos e por transfusões de sangue. A transmissão vetorial ainda ocorre devido ao transporte passivo do barbeiro em roupas e pertences de pessoas que viajam entre as áreas infestadas e não-infestadas (Dias *et al.*, 2002).

1.2. Variabilidade genética nas populações de *T. cruzi*

O *T. cruzi* é um parasito que apresenta uma grande variabilidade genética. Quando obtido de seus hospedeiros mamíferos ou de barbeiros transmissores, seus isolados são, na verdade, compostos por uma população heterogênea. Por isso, um grande número de cepas já foi isolado, identificado e caracterizado utilizando marcadores biológicos (Revisado por Macedo *et al.*, 2004 e Buscaglia e Di Noia, 2003). Essas cepas foram divididas em dois grupos principais: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Momem, 1999). Elas podem ser facilmente agrupadas pela análise do padrão de amplificação pela PCR utilizando iniciadores para o gene do RNA ribossomal e da região espaçadora não transcrita do gene de mini-éxon (Fernandes *et al.*, 1998). É interessante notar que esses grupos parecem ocupar nichos ecológicos diferentes. Os isolados classificados como pertencentes ao grupo *T. cruzi* II são associados principalmente a um ciclo doméstico e, freqüentemente, a infecções humanas (Briones *et al.*, 1999; Zingales *et al.*, 1999), todavia podem ser encontrados no ciclo silvestre (Yeo *et al.*, 2005). Ao passo que o grupo *T. cruzi* I parece estar associado ao ciclo silvestre, circulando entre barbeiros e pequenos mamíferos selvagens como tatus, gambás e roedores (Briones *et al.*, 1999; Zingales *et al.*, 1999). O *T. cruzi* II pode ainda ser dividido em cinco subgrupos: *T. cruzi* IIa, IIb, IIc, IId e IIe segundo análise de RAPD (do inglês, Random Amplification of Polymorphic DNA) e MLEE (do inglês, Multi-locus Enzyme Eletrophoresis) (Brisse *et al.*, 2000). Dados adicionais referentes à análise do gene MSH2 desse parasito, bem como análises de zimodemas e da seqüência de nucleotídeos dos genes da tripanotiona redutase e diidrofolato redutase-

timidilato sintase indicam a presença de três grupos principais sendo que um deles é composto por cepas híbridas (Augusto-Pinto *et al.*, 2003; Miles *et al.*, 1978; Machado e Ayala, 2001; Machado e Ayala, 2002). Freitas e colaboradores (2006) sugeriram uma nova classificação dessas cepas baseadas na caracterização de polimorfismos gerados no loco do gene mitocondrial da citocromo oxidase II, que permitiu a identificação de três clades: A, B e C. Nessa classificação, o grupo *T. cruzi* I não sofreria alterações, pois todos pertenceriam a clade A, o grupo *T. cruzi* II seria composto pelo grupo *T. cruzi* IIb pertencentes a clade C. Um novo grupo, *T. cruzi* III, seria criado agrupando cepas do grupo *T. cruzi* IIc. As cepas *T. cruzi* IIId e IIe seriam cepas que aparecem por eventos de hibridação entre cepas do grupo *T. cruzi* II e III. E que, portanto, não pertencem a nenhum desses grupos.

1.3. Reparo de DNA em *T. cruzi*

O projeto genoma do *T. cruzi* revelou a presença de genes que codificam para muitos dos componentes enzimáticos das vias de reparo (El-Sayed *et al.*, 2005). A maior parte dos genes envolvidos no reparo por excisão de bases está presente em *T. cruzi* e é bem conservada nos três genomas de tripanossomatídeos parasitos (*T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*). Entretanto, esse parasito possui apenas metade das proteínas homólogas a DNA glicosilases descritas em outros organismos. Genes como XPA/RAD14 não foram encontrados, mas outros elementos do reparo por excisão de nucleotídeos indicam que esse sistema deve funcionar nesse parasito e ser semelhante ao de plantas e *Plasmodium falciparum*.

A existência da maquinaria de recombinação já é conhecida em tripanossomatídeos devido à utilização da mesma experimentalmente na manipulação do genoma. O *Trypanosoma cruzi* já foi estavelmente transfectado com o gene da GFP (do inglês, Green Fluorescent Protein) ou gene *CAT* (do inglês, Choramphenicol acetyltransferase). Nos dois casos, foi mostrada a integração no loco do RNA ribossomal por “Southern Blot” (Dos Santos e Buck, 2000; Martínez-Calvillo *et al.*, 1997). Uma outra construção plasmidial também permitiu a integração e transfecção do gene da GFP no loco

do gene da tubulina (DaRocha *et al.*, 2003). O processo que dirige essas integrações em eucariotos inferiores é o processo de recombinação e, portanto, isso é uma forte evidência da ocorrência desse processo em *T. cruzi*. Entretanto, não se conhece o mecanismo molecular de recombinação nesses parasitos que deve ter suas peculiaridades uma vez que proteínas como RAD52 estão ausentes.

Foram isolados e caracterizados funcionalmente produtos de apenas quatro genes envolvidos no reparo de DNA. Um deles foi isolado a partir de biblioteca da cepa Y e apresenta 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. A atividade de UDGase parece ser única e exclusivamente proveniente dessa enzima uma vez que as atividades das enzimas SMUG, TDG e MBD4 não estão presentes em *T. cruzi* (Pena-Diaz *et al.*, 2004). 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. Interessantemente, polimorfismos (SNPs) identificados na seqüência desse gene permitiram que 32 cepas fossem agrupadas, a partir de RFLP, em três haplogrupos (A, B e C) que expressam diferentes isoformas de *TcMSH2* (*TcMSH2a*, *TcMSH2b* e

TcMSH2c, respectivamente). E, ainda, foi observada uma correlação entre esses haplogrupos e variações na eficiência do reparo de erro de pareamento (Augusto-Pinto *et al.*, 2003). Outro gene de reparo identificado foi o da endonuclease NLT1c codificado pelo retrotransposon não-LTR L1Tc. A superexpressão dessa endonuclease pode reduzir em até 60% os danos causados ao DNA do *T. cruzi* pela droga daunorubicina (Olivares *et al.*, 2003).

O metabolismo do DNA em *T. cruzi* oferece uma série de vias e proteínas a serem estudadas, mas dois processos são especialmente interessantes: um é o reparo por excisão de base (BER) e o outro é a recombinação. Ambas as vias, embora altamente envolvidas na manutenção da estabilidade do genoma, podem oferecer mecanismos que permitem o surgimento de variabilidade genética no *Trypanosoma cruzi* assim como sugerido pelo estudo do reparo por erro de pareamento nesse parasito. As enzimas DNA polimerase β , do BER, e Rad51, do processo de recombinação serão os alvos de nossos estudos.

1.4. 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. Essa via é necessária para o reparo da fita de DNA quebrada por agentes como radiação γ . Ela se inicia com o processamento, por nucleases e helicases, das fitas de DNA quebradas (**Figura 1**) (Revisado por Thacker, 2004). Em seguida, é formado um complexo protéico composto por Rad51, Rad52, Rad54, Rad55/57 e RP-A. Essas proteínas participam da invasão da fita simples danificada na dupla fita do cromossomo homólogo ou da cromátide irmã. A estrutura formada nesse

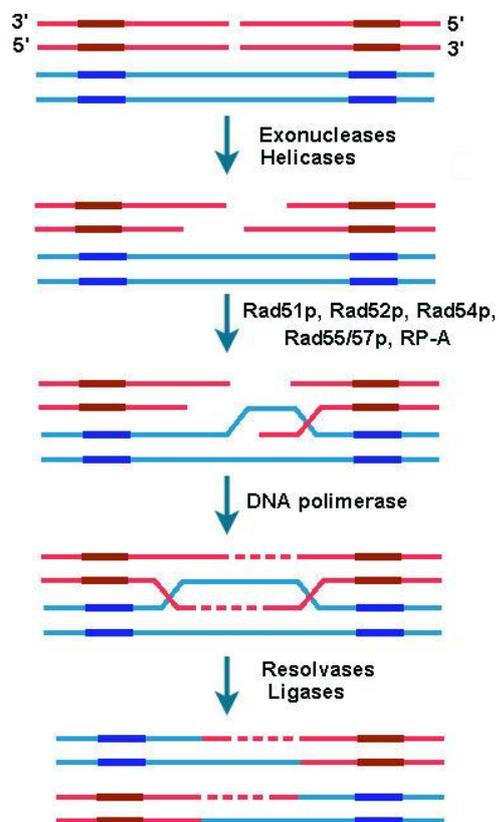


Figura 1. Ilustração esquemática do processo de recombinação e reparo de quebra de dupla fita. Adaptado de Lehniger, 2001.

processo é similar às junções de Holliday observadas no processo de recombinação em bactérias. Por fim, a estrutura é resolvida pela ação de DNA polimerases, ligases e resolvases.

A proteína central nesse processo é a Rad51. Ela tem homologia com a proteína RecA de *E. coli* (Ivanov e Haber, 1997). Essas proteínas são capazes de se polimerizar sobre o DNA de fita simples formando um filamento de nucleoproteínas (**Figura 2**) 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 ao processo de “checkpoint”. 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). Essas duas proteínas são necessárias para a troca entre as cromátides irmãs quando o processo de recombinação está associado a danos ao DNA, sendo dispensáveis quando esse processo é espontâneo (Dong e Fasullo, 2003). Rad52, além de promover o anelamento entre duas fitas de DNA simples (Mortensen *et al.*, 1996), pode também realizar a troca de RPA ligada à fita simples por Rad51 (New *et al.*, 1998). A proteína Rad59 também se liga à fita simples de DNA e poderia auxiliar Rad52 em sua função (Davis e Symington, 2001). A proteína Rad52 também possui variações produzidas por “splicing” alternativo que também são capazes de elevar a taxa de recombinação (Thorpe *et al.*, 2006). Em células de mamíferos, ao contrário do que ocorre em leveduras, Rad52 não é necessário para a formação dos focos de reparo de Rad51 que surgem após irradiação (van Veelen *et al.*, 2005). Essa proteína parece auxiliar o processo de recombinação de forma diferente dependendo do organismo, apesar de ser altamente conservada. 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).

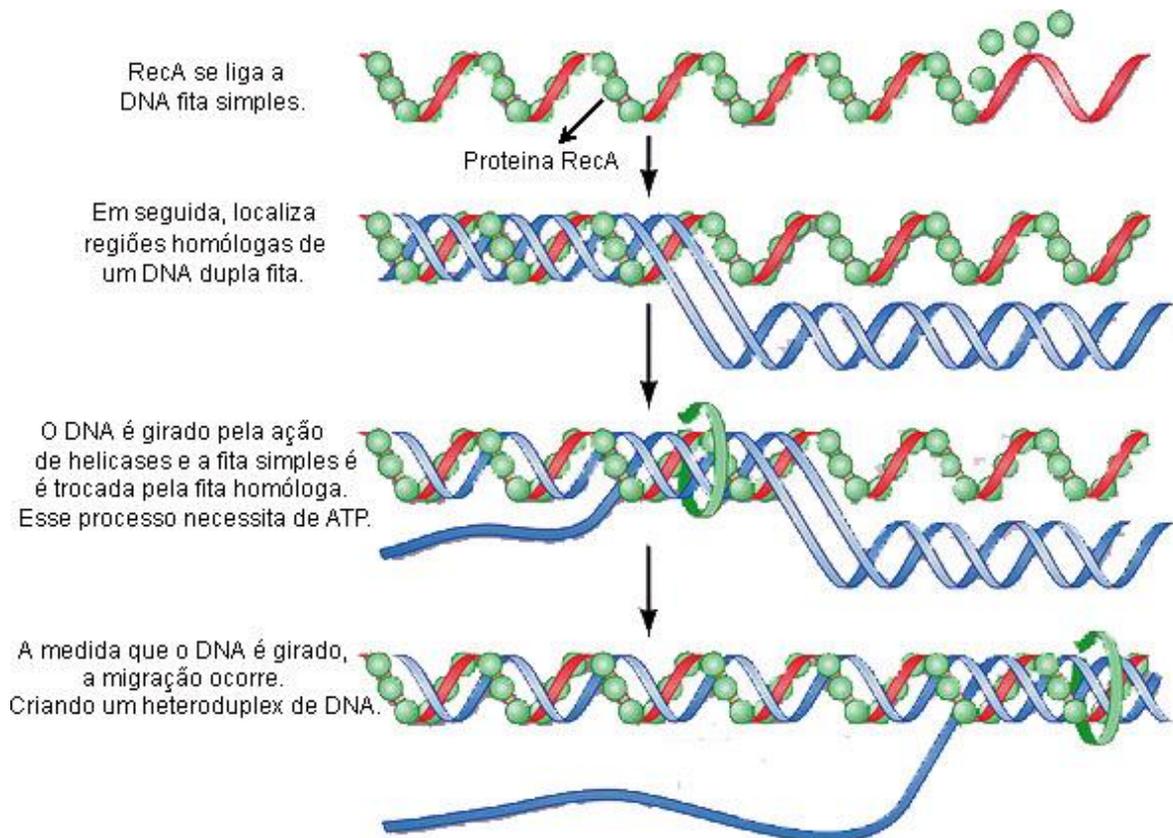


Figura 2. Ilustração esquemática do processo de troca entre fitas simples e dupla de DNA promovidas pela proteína RecA. Adaptado de Lehniger, 2001.

Durante o processo de reparo, a proteína Rad51 se associa à matriz nuclear e Rad54, assim como a outras proteínas como BRCA1 e BRCA2, localizadas junto a Rad51 (Mladenov *et al.*, 2006). Além dessas, proteínas parálogas de Rad51 (Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2, XRCC3) são capazes de interferir sobre o processo de recombinação por interagir ou influenciar a função da própria Rad51. Complexos formados pelas proteínas Rad51C e XRCC3 (complexo CX3) ou Rad51B, C, D e XRCC2 (complexo BCDX2) são capazes de interagir com Rad51. As quebras da fita de DNA estimulam o recrutamento de uma série de proteínas que vão repará-las, surgindo assim um foco de proteínas no local onde as quebras aconteceram. A proteína Rad51C está presente nos complexos CX3 e BCDX2 e além de garantir a regulação da formação do foco de reparo de Rad51, tem também um papel direto ainda não identificado no reparo (Rodrigues *et al.*, 2006). Quando é feita uma dupla mutação nos genes que codificam para Rad51B e D ou para Rad51D e XRCC3 ou mutações nesses mesmos genes individualmente, pode-se observar uma deficiência similar no reparo de lesões causadas por radiação ionizante em todos eles. A análise dos focos de Rad51 nesses mutantes em diferentes tempos é similarmente diminuída. Entretanto, a dupla mutação em Rad51D e XRCC3 tem efeito aditivo frente a lesões causadas por outros agentes como a cisplatina e a camptotecina. Os parálogos de Rad51 têm uma ação conjunta para formação do foco de Rad51, entretanto, eles podem ter papéis diferentes dependendo do tipo de lesão e do estágio do processo de reparo.

1.5. 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 procariotos, são exemplos de proteínas que possuem essa capacidade. Essas duas enzimas guardam homologia estrutural e funcional. Essas proteínas promovem a busca por regiões homóloga do DNA, a invasão da fita simples na dupla fita homóloga (**Figura 2**) 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 a DNA, interação com a molécula de DNA e um domínio de ligação a 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 3**). 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).

1.6. Rad51 e Recombinação em Tripanossomatídeos

O gene *Rad51* já foi descrito em dois organismos próximos a *T. cruzi*: *L. major* e *T. brucei*. O gene *Rad51* de *L. major* (*LmRad51*) foi isolado e seu produto expresso em *E. coli*. Ele codifica para uma proteína de 377 aminoácidos com homologia com Rad51 de vários outros organismos (McKean *et al.*, 2001). A proteína *LmRad51* tem sua expressão aumentada de 24 a 48 horas depois da exposição à fleomicina que é um agente que causa quebras duplas no DNA, sugerindo assim que ela participa no reparo dessas lesões. McKean e colaboradores (2001) foram capazes de mostrar ainda que essa enzima tem atividade ATPásica, ou seja, é capaz de quebrar a molécula de ATP e, também, que ela se liga a DNA fita dupla e fita simples. Assim, a proteína *LmRad51* tem as atividades relacionadas ao processo de recombinação e deve ter alguma relação com a virulência da *L. major*, uma vez que a capacidade de reparar eficientemente as lesões causadas pelo dano oxidativo gerado pela reposta intracelular pode ter relação com a sobrevivência do parasito.

O papel da recombinação em *T. brucei* é mais bem conhecido no processo de variação antigênica. Esse parasito possui em sua membrana uma proteína conhecida como VSG (do inglês, Variant Surface Glycoprotein) codificada por genes que estão localizadas nas regiões teloméricas juntamente com outros genes relacionados à virulência do *T. brucei* (Revisado por Pays, 2006). Esse padrão de organização é semelhante às ilhas de patogenicidade

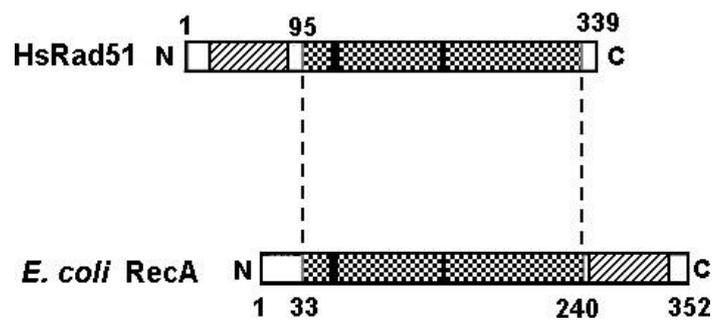


Figura 3. Comparação entre as proteínas Rad51 humana (HsRad51) e RecA de *E. coli*. Região listrada indica a porção N-terminal de HsRad51 e C-terminal de RecA. O quadriculado indica a região em que há maior homologia entre essas duas proteínas. Adaptado de Shinoraha *et al.*, 1993.

encontradas em bactérias. A forma sanguínea desse parasito expressa cerca de 10^7 moléculas de um único tipo de VSG. Caso o hospedeiro apresente uma resposta imunológica contra essa proteína, um novo tipo de proteína é selecionado e, então, é possível observar que há uma mudança na antigenicidade dessa proteína uma vez que um novo gene de VSG passa ser expresso. Existem cerca de 1700 genes para VSGs sendo a maioria pseudogenes (Berriman *et al.*, 2005). Eles se localizam tanto nos minicromossomos (de 50 a 150Kb) quanto nos cromossomos maiores. Interessantemente, apenas um desses genes é expresso por vez. Uma das formas de se modificar o gene que será expresso é pelo processo de recombinação (Pays *et al.*, 2004; McCulloch *et al.*, 1999). O nocaute do gene *TbRad51* causa uma diminuição na capacidade de se realizar essa troca, confirmando assim que o gene *TbRad51*, assim como o processo de recombinação, é essencial no processo de evasão do sistema imunológico do *T. brucei* durante a infecção do hospedeiro mamífero (McCulloch *et al.*, 1999). Vários genes parálogos a Rad51 estão envolvidos na regulação do processo de recombinação. Em células eucarióticas, já foram descritos: Rad51B, Rad51C, Rad51-D, XRCC2 e XRCC3. *T. brucei* também possui cinco parálogos RAD51-3, RAD51-4, RAD51-5, RAD51-6 e DMC1. Rad51-3 e Ra51-5 já foram nocauteados nesse organismo e sua deficiência está correlacionada à sensibilidade a metil-metanosulfonato, e eles devem ter um papel regulatório na recombinação assim como os parálogos de Rad51 em outros eucariotos (Proudfoot e McCulloch, 2005). Rad51-3 participa ainda do processo de troca das VSGs assim como Rad51, uma vez que o nocaute desse gene causa uma diminuição na eficiência desse processo (Proudfoot e McCulloch, 2005).

Em *T. cruzi*, o processo de recombinação não é completamente compreendido. Entretanto, há algumas evidências da sua importância para a biologia do parasito (Revisado por Machado *et al.*, 2006). O *T. cruzi* possui um alto grau de homozigose em seu genoma quando marcadores como os locos de isoenzimas e de microsátélites são analisados (Miles *et al.*, 1978; Oliveira *et al.*, 1998). Ainda, alelos dos genes da tripanotiona redutase e diidrofolato redutase-timidilato sintase são também homozigotos em várias cepas de *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Machado e Ayala, 2001). Esse grau de homozigose não é esperado para organismos como *T. cruzi* que se reproduzem assexuadamente

por divisão binária. De fato, esperava-se uma alta heterozigose, pois em organismos com esse tipo de reprodução, a evolução dos alelos de um gene ocorre de maneira independente uma vez que o acúmulo de mutações é independente. Tal efeito é denominado “efeito Meselson” e já foi observado em rotíferos bdelóides assexuados (Welch e Meselson, 2000). Há quatro maneiras de se explicar a ausência do efeito Meselson em *T. cruzi*. A primeira é por causa de automixia que não foi descrita nesse parasito. A segunda é por eventos de reprodução sexuada. O *Trypanosoma cruzi* é capaz de efetuar trocas gênicas (Gaunt *et al.*, 2003). Além disso, algumas cepas híbridas já foram descritas nesse parasito (Machado e Ayala, 2001; Brisse *et al.*, 2003). Entretanto, esses eventos são muito raros e não podem explicar o alto grau de homozigose. As outras duas envolvem a recombinação mitótica e a conversão gênica que podem ter a participação de Rad51. Esses fenômenos podem ilustrar a importância do gene Rad51 e do processo de recombinação mitótica na biologia do *T. cruzi*.

1.7. A proteína Rad51 de *T. cruzi*

Durante minha dissertação de mestrado, 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 região codificadora 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 uma cópia 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. Além dos experimentos voltados para a caracterização desse gene, verificamos também aspectos de evolução molecular em onze 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 abriram 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 no DNA. Com a intenção de melhor compreendermos o papel da recombinação em *T. cruzi*, nesse trabalho continuamos com a caracterização do gene *TcRad51*.

1.8. Reparo por Excisão de Base

O Reparo por Excisão de Base foi outra via de interesse de nossos estudos devido a sua relação com a correção de um grande número de lesões espontâneas geradas por produtos do metabolismo celular. Uma proteína central nesse processo é a DNA polimerase β (DNA pol β). O estudo de sua função em células de eucariotos tem sido de grande importância no conhecimento do metabolismo de DNA, inclusive em alguns tipos de câncer. Pouco se sabe a respeito dessa enzima em tripanossomatídeos e, especialmente, em *T. cruzi*. O fato de ela conter um sinal de endereçamento mitocondrial abre muitas questões a respeito do seu papel nesse parasito. O estudo desse gene em *T. cruzi* pode trazer informações importantes sobre a biologia desse protozoário.

1.9. DNA polimerase β (DNA pol β) e Reparo por Excisão de Base

Em células de eucariotos, já foram descritas pelo menos quatorze DNA polimerases que diferem pelas subunidades, pela atividade enzimática e pela função no metabolismo do DNA (Friedberg *et al.*, 2006). A DNA pol β é capaz de preencher pequenos espaços no DNA (Chagovetz *et al.*, 1997) e, em células de mamíferos, está envolvida no reparo por excisão de base (Sobol *et al.*, 1996). Esse tipo de reparo é subdividido em duas vias de acordo com o número de nucleotídeos que são adicionadas após a excisão que, por sua vez, é determinado pelo conjunto de proteínas que são recrutadas para exercer essa função (**Figura 4**). Inicialmente, uma DNA glicosilase reconhece a base lesada e a remove criando um sítio AP. A perda da base pode acontecer também espontaneamente na molécula de DNA e os sítios AP estão entre os tipos de lesões mais comuns. Em seguida, AP endonuclease 1 (APE1) promove a quebra da ligação fosfodiéster 5' da lesão (Matsumoto e Kim, 1995, Demple e Sung, 2005). No reparo por excisão de base de um só nucleotídeo, a DNA pol β remove um resíduo de desoxirribose fosfato (dRP) 5'-terminal (Matsumoto e Kim, 1995, Prasad *et al.*, 2005) e, então, adiciona um nucleotídeo no espaço resultante. Um complexo formado por XRCC1 e a DNA ligase III α termina processo fazendo a ligação 3' do nucleotídeo adicionado. No reparo por excisão de base de via longa, a DNA pol β é a principal enzima responsável pelo preenchimento de "gaps" de dois a seis nucleotídeos uma vez que extratos celulares deficientes nessa enzima mostram uma reduzida capacidade de efetuar o reparo através dessa via (Dianov *et al.*, 1999), entretanto, a DNA pol δ pode substituí-la nesse preenchimento. A enzima FEN1 é a responsável pela remoção do esqueleto de carbono e dos nucleotídeos da pequena fita simples excedente que se forma. A ligação da fita nessa via é feita pela DNA ligase I. A deleção do gene da DNA pol β em camundongos é letal, indicando que essa enzima é essencial para o desenvolvimento embrionário (Gu *et al.*, 1994). Além disso, células embrionárias deficientes mostram um aumento na sensibilidade a agentes alquilantes.

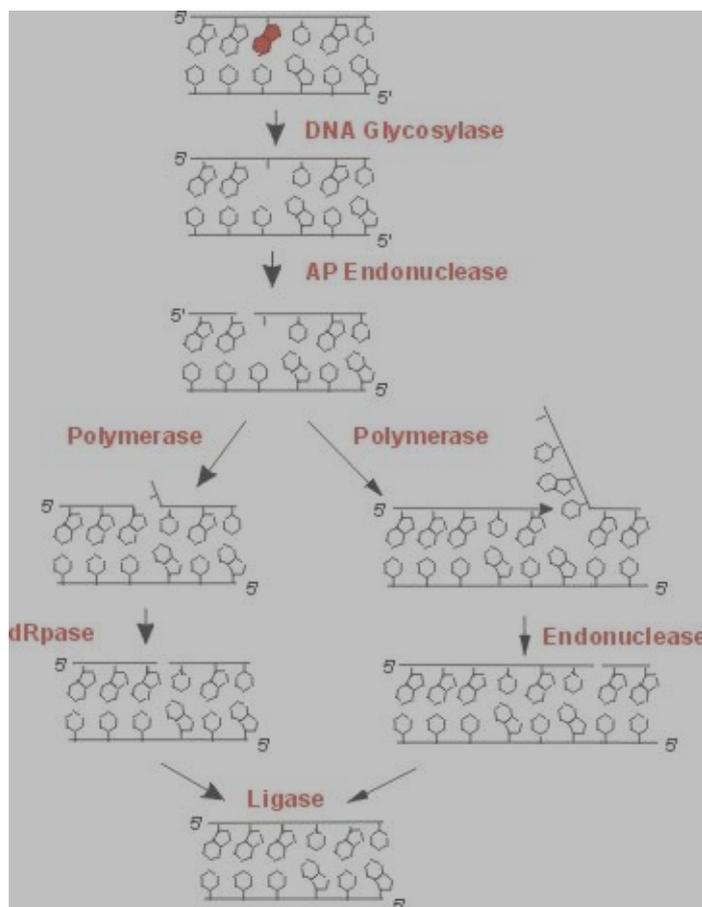


Figura 4. Ilustração esquemática do reparo por excisão de base: à esquerda, está representada a via de excisão de apenas um nucleotídeo e a direita, a via longa de excisão. Adaptado do sítio web.mit.edu/bevin/www/ber.shtml.

A via de reparo por excisão de bases é uma via altamente organizada e a interação entre suas proteínas parece ser determinante para o bom andamento desse processo. Um modelo foi sugerido para explicar o funcionamento dessa via, ele foi chamado de “passando o bastão” (Wilson e Kunkel, 2000). Nele, uma enzima estimula a ligação ao substrato da próxima enzima, semelhante à passagem do bastão por velocistas em uma corrida. A mutação V86R em XRCC1 impede o complexo formado por esta enzima e a DNA ligase III α de se ligar a DNA pol β o que diminui a eficiência do BER, sugerindo que a ligação desse complexo a DNA pol β é necessária para que o mesmo chegue mais facilmente ao seu substrato (Parsons *et al.*, 2005). Esse complexo seria determinante também em definir qual caminho o BER seguiria: longo ou curto (Petermann *et al.*, 2006). A APE1, além da atividade revisora, estimula a síntese com deslocamento de fita pela DNA pol β bem como a atividade de dRP liase (Sukhanova *et al.*, 2005). Por outro lado, a PARP-1 inibe a atividade dessa mesma enzima indicando que a DNA pol β tem sua função regulada pela interrelação entre ela, a PARP-1 e a APE1 (Sukhanova *et al.*, 2005). A enzima FEN1 também pode estimular a síntese de DNA pela DNA pol β que, por sua vez, coopera na atividade dessa enzima (Liu *et al.*, 2005). A atividade de síntese com deslocamento da fita pela DNA pol β também é influenciada pela proteína WRN (Harrigan *et al.*, 2003), essa proteína tem atividade de helicase e de exonuclease, ambas no sentido 3'-5' (Harrigan e Bohr, 2003), e está ausente na Síndrome de Werner. Interessantemente, as atividades de exonuclease e helicase cooperam com a DNA pol β na remoção de nucleotídeos pareados incorretamente durante o BER (Harrigan *et al.*, 2006).

1.10. DNA pol β em Tripanossomatídeos

Até o presente momento, já foram descritas DNA polimerases β em três organismos da família dos tripanossomatídeos. A primeira caracterização foi feita em *Crithidia fasciculata* e correspondia a uma polimerase de 47-kDa isolada a partir do cinetoplasto, uma estrutura associada à mitocôndria que é característica dos cinetoplastídeos. A proteína isolada possuía características

bem comuns às das DNA polimerases β , em contrapartida, era bem diferente da DNA pol γ que é a polimerase geralmente associada aos processos de metabolismo de DNA em mitocôndrias de outros eucariotos (Torri *et al.*, 1994). Em seguida, o gene que codifica essa enzima foi clonado e verificou-se que seu produto tem 33% de identidade com a DNA pol β humana. Além disso, ela apresentava sinal de localização para a mitocôndria bem como o sítio de clivagem característico para o transporte para essa organela. A DNA pol β foi, então, classificada como mitocondrial, embora nenhum experimento de localização da proteína tenha sido feito. A função atribuída a ela seria o preenchimento de “gaps” nas moléculas do DNA do cinetoplasto durante o processo de replicação (Torri e Englund, 1995). O gene *DNA pol β* de *Leishmania infantum* foi clonada pela PCR e, logo em seguida, foi utilizado para a obtenção da proteína em fusão com uma cauda de histidina em *E. coli*. A proteína purificada foi usada em imunizações em camundongos para a produção de anticorpos. Experimentos de imunofluorescência indicaram que, em *L. infantum*, a DNA pol β se localiza no núcleo (Taladriz *et al.*, 2001). Em *T. brucei*, duas polimerase β foram clonadas. Uma possui 70% e a outra 30% de identidade com a DNA pol β de *C. fasciculata*. Quando em fusão com essas enzimas, a GFP foi direcionada para a mitocôndria (Saxowsky *et al.*, 2003).

Em cultura de células humanas, o AZT é capaz de inibir o crescimento da forma amastigota do *T. cruzi* (Nakajima-Shimada e Aoki, 1998). Entretanto, a inibição não está relacionada à ação desse fármaco sobre a atividade de transcriptase reversa como observado no caso da AIDS. As DNA pol β , caracterizadas até o momento, são capazes de inserir o AZT no DNA, portanto, é possível que a DNA pol β seja relevante no mecanismo de ação do AZT. Assim, tendo em vista a importância dessa enzima para o entendimento da biologia do *T. cruzi*, do seu possível envolvimento na geração de variabilidade, bem como a possibilidade de novas abordagens para o tratamento da doença de Chagas surge nosso interesse no estudo dessa enzima.

1.11. Como proteínas envolvidas na manutenção da estabilidade genômica poderiam gerar variabilidade genética?

Em células humanas, a superexpressão da DNA pol β é capaz de aumentar a taxa de mutação celular (Canitrot *et al.*, 1998), e foi também associada a mudanças genéticas mais complexas como, por exemplo, aneuploidia e deficiência em “checkpoints” mitóticos (Bergoglio *et al.*, 2002). As DNA polimerases β são enzimas sem atividade revisora e, portanto, quando tem sua expressão aumentada, essas enzimas podem dar a célula um fenótipo mutador, ou seja, a célula possui um número aumentado de mutações ou outros tipos de mudanças genéticas que podem ser vantajosos ou não, mas que podem conferir uma plasticidade evolutiva, permitindo sua sobrevivência em ambientes instáveis e de forte seleção natural. A expressão aumentada da DNA pol β já foi detectada em diversas células tumorais incluindo gliomas e linfomas, câncer de mama, cólon, próstata (Srivastava *et al.*, 1999) e leucemia crônica (Canitrot *et al.*, 2006).

A proteína Rad51 também pode fornecer uma fonte de instabilidade genética não só por sua ausência, mas também por seu excesso. Proteínas envolvidas no reparo por recombinação, como Rad51, quando mutadas ou não expressas provocam uma diminuição na fidelidade dessa via de reparo o que gera instabilidade cromossômica, sensibilidade a agentes causadores de “cross-linking” e a irradiação (Thompson e Schild, 2001). Por outro lado, a hiperatividade da maquinaria de recombinação também é responsável pela geração de instabilidade genética através de recombinações inapropriadas, resultando em translocações, deleções, duplicações e perda de heterozigose (Thacker, 2004). A superexpressão de Rad51 e instabilidade genética associada a esse fenômeno já foi observada em uma série de tumores (Han *et al.*, 2002, Maacke *et al.*, 2000a, Maacke *et al.*, 2000b, Raderschall *et al.*, 2002 e Xia *et al.*, 1997), mas a importância do mesmo para o surgimento e/ou progressão do tumor ainda não foi estabelecida, sendo que deve haver uma possível relação com mecanismos de resistência a drogas.

Uma vez que essas duas proteínas são candidatas para geração de variabilidade genética em *T. cruzi* e tendo em vista a importância desse

processo na biologia desse parasito, iniciamos o estudo de caracterização das mesmas bem como dos genes que as codificam.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Caracterização dos genes *Rad51* e *DNA polimerase β* que estão envolvidos no metabolismo de DNA de *Trypanosoma cruzi* e, também, estudo da proteína codificada pelo gene da DNA polimerase β .

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar a capacidade do gene *Rad51* de *T. cruzi* de participar da recombinação utilizando CHO modificadas para se medir esse processo.

- Investigar a resposta do *T. cruzi* frente à radiação γ , avaliando-se o crescimento da forma epimastigota desse protozoário após irradiação ou não. Será verificado também o efeito desse agente sobre as bandas cromossômicas de *T. cruzi*. Avaliar, também, os níveis de mRNA para o gene *TcRad51* após a exposição a esse agente.

- Clonar o gene da DNA polimerase β do *Trypanosoma cruzi*. Determinar sua seqüência e identificar na mesma característica que permitam associá-la as DNA polimerase da família X, através de comparação da mesma com DNA polimerases β de outros organismos.

- Verificar a habilidade desse gene em sintetizar DNA *in vivo* através de ensaios de complementação em bactérias deficientes para o gene da DNA polimerase I. Avaliar a possibilidade da DNA polimerase β em participar do processo de síntese translesão de lesões causadas pela luz U.V. através da irradiação dessas bactérias.

- Produzir a proteína DNA polimerase β em *E. coli* utilizando a fusão da mesma com o gene da Maltose Binding Protein (MBP). Verificar a sua capacidade de síntese de DNA *in vitro* e definir suas condições ótimas de funcionamento.

- Avaliar o papel da DNA polimerase β na incorporação de nucleotídeos no DNA utilizando o AZT. Determinar a incorporação desse nucleotídeo *in vivo* em epimastigotas de diferentes cepas de *T. cruzi*. Verificar *in vitro* a incorporação de AZT no DNA pela DNA polimerase β . Verificar também a

capacidade da DNA polimerase β em incorporar didesoxirribonucleotídeos no DNA *in vitro*.

- Determinar o potencial da DNA polimerase β como uma proteína geradora de mutações através da análise *in vitro* da incorporação de nucleotídeos incorretos durante o processo de síntese de DNA.

- Verificar a expressão dessa enzima em extratos citoplasmático, nuclear e total da forma epimastigota de *T. cruzi*.

3. Material e Métodos

3.1. Meios de cultura e linhagens de bactérias e células eucarióticas

Nos experimentos com bactérias, foi utilizado o meio 2x YT (Bactotripton 16g/L, extrato de levedura 10g/L, NaCl 5g/L). O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH (1N) e o meio esterilizado por autoclavação. Para produção do meio sólido, foi adicionado ágar 1,5% antes da autoclavação. As linhagens de bactérias utilizadas nesse trabalho são descritas na **Tabela I**. Ampicilina (100µg/mL) foi adicionada ao meio de cultura para a seleção de bactérias com plasmídeos.

Nos experimentos com células eucarióticas, foi utilizado o meio de cultura D-MEM suplementado com glutaMAX[®] (Invitrogen), soro fetal bovino 10%, 100mg/mL de estreptomicina e 100U/mL de penicilina. As células foram de ovário de hamster (CHO) da linhagem K1 DRA10 (Liang *et al.*, 1998).

As culturas da forma epimastigota de *T. cruzi* eram mantidas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptone - liver digest neutralized* 5g/L, NaCl 4g/L, bactotripton 5g/L, KCl 0,4g/L, NaH₂PO₄ 8g/L, dextrose 2g/L, 10mL de hemina 0,2% em NaOH 0,05M, pH 7,3). O meio foi suplementado com soro fetal bovino 10% (Cultilab), penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100µg/ml) (Invitrogen). As culturas eram mantidas em estufa a 28°C. As cepas CL Brener, Colombiana e JG foram gentilmente cedidas pelo Dr. Égler Chiari do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

3.2. PCR e clonagens

Foram feitas PCRs utilizando os iniciadores descritos na **Tabela II**. Nas amplificações, as condições gerais foram 10pmol de cada iniciador, 1x tampão IB (Phoneutria, MgCl₂ 1,5mM; KCl 50mM; Triton X-100 0,1%; Tris HCl pH 8,4 10mM), 50 µM de dNTPs e 2,5 unidades de Taq polimerase (Phoneutria) em um volume final de 50µL. Foram adicionados 20µL 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;

Tabela I. Características genótípicas das cepas de *E. coli* AB1157, DH5- α e SC12-17.

Cepa	Características genótípicas	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<i>lacZ</i> M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1</i>	Hanahan, 1983
SC18-12	<i>recA718 polA12 uvrA155 trpE65 lon-11 sulA11</i>	Loeb e Sweasy, 1983

Tabela II. Lista de iniciadores.

Iniciador	Seqüência 5' – 3'
PB50	ATG TTT CGT GCG ACG
PB81	GGR TCN GKR TTY TC
PolBamHI	GGA TCC TCA TGG GTC TCG GTT CTC GGG
Rad51Xho	CCG CTC GAG ATG AAC ACC CGC TCC AAG AG
Rad51Xba	CTA GTC TAG ATC AAT CCC TTG CAT CCC CAA
M13 Reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC
M13(-20)	GTA AAA CGA CGG CCA G

- (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.

A PCR de colônia bacteriana foi feita no volume de 10µL, mantendo-se as concentrações finais dos reagentes como no protocolo geral. O DNA molde para reação era obtido tocando a colônia bacteriana com um palito estéril e introduzindo-o rapidamente no tubo da reação. Para clonagens, a PCR era feita utilizando-se uma diluição 1/10 da Pfu polimerase (Promega) em Taq polimerase (Phoentria ou Promega). O DNA molde era utilizado na concentração de 0,04ng/µL e era obtido de epimastigotas da cepa Tulahuén de *T. cruzi* e, em certos casos, de plasmídeos onde o gene já havia sido clonado.

Para clonagem em vetor para o seqüenciamento, foram usados os iniciadores PB50 e PB81 (**Tabela II**) e DNA molde da cepa Tulahuén na amplificação do gene da DNA pol β e, em seguida, o amplicon foi clonado no vetor pCR2.1 (**Anexo I**) do conjunto de reagentes “TOPO-TA cloning kit for sequencing” (Invitrogen) segundo especificações do fabricante.

Para clonagem em vetor de expressão (pMAL, New England Biolabs) em *E. coli*, uma nova amplificação foi feita utilizando os iniciadores PB50 e polBamHI (**Tabela II**) e, como DNA molde, plasmídeo carregando o gene já clonado. Em seguida, o amplicon foi clonado no vetor pCR2.1 do conjunto de reagentes “TOPO-TA cloning kit for sequencing” (Invitrogen) segundo especificações do fabricante e purificado pela “Miniprep” de 3mL de cultura das bactérias selecionadas. O plasmídeo purificado e o pMAL-c2-Genenase (**Anexo I**, New England Biolabs) foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* em tampão apropriado com 2µg de DNA. O inserto e o vetor pMAL foram purificados a partir de gel de agarose 1% usando o conjunto de reagentes Concert Rapid Gel Extraction System (Invitrogen). A ligação foi feita usando 50ng de vetor e 100ng de plasmídeo a 16°C por 2 horas.

Para clonagem do gene *TcRad51* no vetor de expressão de CHO, uma nova amplificação foi feita utilizando os iniciadores Rad51Xho e Rad51Xba (**Tabela II**), e, como DNA molde, plasmídeo pUC18 (**Anexo I**, GE Healthcare) contendo o gene. Em seguida, o amplicon e o plasmídeo de destino foram

digeridos com as enzimas *Xho*I e *Xba*I (New England Biolabs). A ligação foi feita usando 50ng de vetor e 100ng do amplicon a 16°C por 2 horas.

3.3. Transformação de *E. coli* competentes

As linhagens de *E. coli* DH5- α , AB1157, SC12-17 foram tornadas eletrocompetentes para transformação com plasmídeos. Brevemente, cerca de 1L da cultura de interesse com D.O. a 600nm entre 0,6 e 0,8 foi centrifugada a 7500xg por 10min, e lavada três vezes com cerca de 200mL de glicerol 10%. A última lavagem foi feita com 50mL de glicerol 20%. Em seguida, as células foram solubilizadas em 1mL de glicerol 10%. A D.O. da diluição 1/10 foi medida e, foi adicionado glicerol 10% para que a D.O. a 600nm dessa diluição fosse 0,15. As células foram alíquotas no volume de 40 μ L e estocada a -80°C. Para a transformação, uma alíquota de 40 μ L da célula de interesse foi incubada com a ligação ou plasmídeo de interesse por 5 minutos no gelo. Em seguida, as células foram transferidas para uma cubeta 0,2cm (Bio-Rad) e mantidas no gelo. A eletroporação foi feita utilizando o programa Ec2 do eletroporador MicroPulser (Bio-Rad). A voltagem desse programa é de 2,5kV. Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado 200 μ L de meio 2x YT e as células foram transferidas para tubos de 1,5mL. Esses tubos foram, então, incubados por 45 minutos a 37°C. Duas placas de 2x YT ágar 1,5% com ampicilina (100 μ g/mL) eram feitas para cada eletroporação, em uma, eram colocados 50 μ L das células eletroporadas, e na outra, o volume restante. As células eram incubadas a 37°C durante a noite. A presença de plasmídeos com inserto era detectada pela PCR de colônia.

3.4. Extração de plasmídeos pela técnica de “minipep” e “midiprep”

Para a minipep, cerca de 3mL de meio de cultura saturado com as bactérias contendo o plasmídeos recombinantes foi centrifugado a temperatura ambiente a uma rotação de 15500xg 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 os reagentes “Wizard Plus Minipreps DNA Purification System” (Promega). A extração foi feita segundo as normas descritas pelo fabricante.

Para a midiprep, cerca de 500mL de meio de cultura saturado com as bactérias contendo o plasmídeos recombinantes foi centrifugado a temperatura ambiente a uma rotação de 7500xg 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 os reagentes do “QIAGEN Plasmid Midi kit” (QIAGEN) segundo as normas descritas pelo fabricante.

Após a extração pela “miniprep” ou “midiprep”, foi feita uma estimativa da concentração de DNA através da eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

3.5. Reações de seqüenciamento.

Todos os plasmídeos utilizados neste trabalho foram seqüenciados em ambas as direções usando o seqüenciador automático capilar MegaBACE 1000 (GE Healthcare). As reações de seqüenciamento foram feitas com os reagentes do “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit”, segundo as normas do fabricante (GE Healthcare), utilizando-se entre 300 a 400ng do DNA de interesse e 5pmol de iniciador M13 “universal” ou “reverse” (**Tabela II**). 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 (GE Healthcare).

Os seqüenciamento foram feitos no Laboratório de Genética-Bioquímica e no Núcleo de Análises de Genoma e Expressão Gênica (NAGE), ambos no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

3.6. Eletroforese em campo pulsátil (PFGE)

Epimastigotas de *T. cruzi* foram crescidos em meio LIT a 28°C até a fase exponencial. A concentração de parasitos foi determinada por contagem em cinco replicatas em câmara de Neubauer. Volumes conhecidos de meio de cultura contendo os parasitos foram centrifugados a 1700xg por 20 minutos a temperatura ambiente; logo após o sobrenadante foi descartado e as células foram solubilizadas cuidadosamente em solução salina NaCl 0,85% estéril. Após novo ciclo de lavagem, as células foram cuidadosamente solubilizadas em PSG (NaH₂PO₄ 75mM; NaCl 60mM; Glicose 10%), a uma concentração de 10¹⁴ parasitos por 100µL. Igual volume de agarose LMP 1% fundida em ddH₂O à temperatura de aproximadamente 40°C foi acrescida à suspensão de parasitos. Após homogeneização, a mistura foi imediatamente depositada em moldes no formato de blocos de volume de 100µL, deste modo, a concentração final de parasitos foi sempre de 10⁷ células por bloco. Após cerca de 20 minutos a 4°C, os blocos foram mergulhados em um grande volume de solução ESP (EDTA 0,5M; Lauroyl sarcosine 1%; Proteinase K 0,5mg/mL), e mantidos a 50°C sob agitação lenta por 48 horas. Após lavagem em EDTA pH 8,0 0,5M, os blocos foram armazenados a 4°C até o momento da eletroforese por PFGE.

As bandas cromossômicas das populações de parasitos CL Brener, irradiadas ou não, foram separadas através de eletroforese de campo pulsátil (PFGE) conforme condições descritas por Cano e colaboradores (1995) com algumas modificações. Blocos inteiros contendo moléculas de DNA dos parasitos foram aplicados em géis de agarose de baixa endosmolaridade 1,2% em 0,5x TBE, (BioRad ou FMC bioproducts) ao lado de padrões comerciais de peso molecular (cromossomos de *Hansenula wingei*, BioRad). Os géis foram submetidos à eletroforese de campo pulsátil em um aparelho GeneNavigator (GE Healthcare) em tampão 0,5x TBE, sob temperatura constante de 8,2°C (modificado a partir de Cano *et al.*, 1995). A eletroforese consistiu em pulsos de

90 segundos em cada direção (N/S e E/W) por 30 horas, 120 segundos durante 30 horas, 180 segundos por 25 horas, 210 segundos por 25 horas e 350 segundos por 25 horas totalizando 135 horas (modificado a partir de Cano *et al.*, 1995). Após a corrida, os géis foram corados em uma solução brometo de etídeo 1% e fotografados através de um aparato digital Vilber Luormat DP-001. Algumas destas imagens foram submetidas a análises por densitometria através do Software photodocumentation system FDC V.10.

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

RNA total da cepa CL Brener de *T. cruzi* tratada ou não com 500Gy foram obtidos a partir de cerca de 1×10^9 células, utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen) segundo o protocolo descrito pelo fabricante. Após a extração, era feita a dosagem da concentração de RNA medindo-se a D.O. a 260nm.

3.8. "Northern blot"

Os géis de agarose para análise das amostras de RNA foram realizados na concentração 1% em tampão 1x MOPS/EDTA (MOPS pH 7,0 0,02M; Acetato de sódio 5mM; EDTA 1mM) e 2% formaldeído (Sambrook *et al.*, 1989). Foram adicionados 25 μ L de tampão de amostra (0,75mL de Formamida deionizada; 0,15mL de tampão 10x MOPS; 0,24mL de Formaldeído; 0,1mL de Água; 0,1mL de Glicerol; 0,08mL de Azul de Bromofenol 10% (p/v)) em 5 μ L de amostra e incubado a 65°C por 15 minutos. Em seguida, 1 μ L de brometo de etídeo 1,0mg/mL foi adicionado às amostras e estas aplicadas no gel. Após a corrida, o gel foi analisado em transiluminador de U.V. O gel que foi utilizado na transferência foi tratado inicialmente com solução NaOH 50mM por 20 minutos, e em 20x SSC por 40 minutos. Os RNAs foram transferidos para membrana Hybond-N (GE Healthcare) por capilaridade em solução 10x SSC.

Após a transferência, a membrana foi lavada em 2x SSC e o DNA imobilizado com luz ultravioleta utilizando-se o aparelho UVStratalinker (Stratagene). A membrana foi pré-hibridada em 40mL de solução de hibridação (formamida 50% (v/v); 6x SSC; 10x Denhardts; SDS 0,2%; DNA de esperma de

salmão 75µg/mL) a 42°C por 2 horas. A hibridação foi conduzida por 24 horas em 20mL de solução hibridação contendo sonda para o gene *TcRad51*, previamente desnaturada a 100°C durante 5 minutos. A sonda foi marcada com ³²P como descrito no item 3.9. Em seguida, procederam-se duas lavagens da membrana em solução de 2x SSC e SDS 0,1% a 65°C. Após a lavagem, a membrana foi selada e exposta a filme de raios X a -80°C em cassete. A revelação foi feita após diferentes tempos de exposição.

3.9. Marcação de sondas com ³²P e purificação da sonda radioativa

As sondas utilizadas para o “Northern blot” foram construídas a partir da amplificação pela PCR. O produto de PCR foi submetido à 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 recomendações do fabricante. Após a estimativa da concentração de DNA feita em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, 100ng de fragmento de DNA purificado foi adicionado à reação de marcação de acordo com as indicações do fabricante do Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim Biochemica), utilizando-se 50µCi de α³²P-dCTP por reação. Após 30 minutos de marcação a 37°C, as reações eram bloqueada com 2µL de EDTA 0,2mol/mL pH 8,0. Foi utilizado sistema de gel de filtração molecular para eliminação de nucleotídeos não incorporados. A coluna utilizada foi a Nick Columns (GE Healthcare). O nível de radiação das frações foi verificado 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.

3.10. Expressão e purificação da DNA pol β em *E. coli*

A bactéria transformada com o plasmídeo pMAL contendo o gene da DNA pol β , selecionada pela PCR da colônia, foi colocada para crescer durante a noite no volume de 15mL de meio 2x YT e 100 μ g/mL de ampicilina. No dia seguinte, esse volume era adicionado a 1L de meio 2x YT com ampicilina na mesma concentração. A bactéria era deixada crescer a 25°C até atingir D.O. a 600nm entre 0,6 e 0,8. Em seguida, foi adicionado IPTG na concentração final de 0,6mM, e foi retirada uma alíquota a cada 1 hora.

Após 4 horas de expressão, a cultura foi centrifugada por 10 minutos a 7500xg. O sobrenadante foi descartado e as células foram solubilizadas em tampão da coluna de maltose (Tris HCl pH 7,4 200mM; NaCl 200mM e EDTA 1mM). Foi adicionada lisozima e, após 30 minutos de incubação, o material foi sonificado por 1 minuto e 45 segundos a amplitude de 30% com pulsos de 15 segundos "ON" e 15 segundos "OFF". Em seguida, foi feita uma centrifugação à 3000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido para passagem na coluna de maltose (New england biolabs) segundo as especificações do fabricante. O precipitado, correspondente à fração insolúvel, foi solubilizado em 10mL sarcosil 1%, centrifugado a 3000xg por 10 minutos, e o sobrenadante foi diálisado contra água mili-Q durante a noite. O sobrenadante dialisado foi diluído em 40mL de tampão da coluna e usado para passagem na coluna de maltose.

3.11. Ensaio de complementação funcional em bactéria

Bactérias *E. coli* da cepa SC18-12 e AB1157 (**Tabela I**), transformadas com plasmídeos pMAL e pMAL contendo o gene da DNA pol β , foram submetidas a diferentes doses de luz U.V. para se medir a sensibilidade das mesmas.

Em outro ensaio, essas mesmas bactérias foram plaqueadas em meio 2x YT sólido suplementado com ampicilina (100 μ g/mL) e colocadas para crescer a temperatura de 30°C e 42°C durante a noite.

3.12. Ensaio de recombinação em células eucarióticas

O gene *Rad51* de *Trypanosoma cruzi* (*TcRad51*) foi clonado no plasmídeo pcDNA 3.1 (**Anexo I**, Invitrogen) que permite a transfecção estável de CHO K1 DRA10 (Liang *et al.*, 1998). Alguns clones foram selecionados e colocados na presença de 1mg/mL G418 para se determinar o número de células que se tornam resistentes a esse antibiótico. Esse número representa o número de recombinantes o que permite avaliar a participação desse gene no processo de recombinação.

3.13. Ensaio *in vitro* de síntese de DNA

A habilidade da DNA pol β em sintetizar DNA foi avaliada pela incorporação de nucleotídeos a um iniciador marcado radiotivamente ou com fluoresceína. Para isso, purificamos a proteína DNA pol β em fusão com a MBP (Proteína que se liga à maltose). Foram construídos dois oligonucleotídeos: um de 16-mer (**Tabela III**) que corresponde ao iniciador e um de 30-mer (**Tabela III**) que corresponde à fita molde para síntese. O oligonucleotídeo de 16-mer foi marcado com radioatividade usando-se ATP radioativo e a proteína cinase (New England Biolabs) segundo as normas do fabricante da enzima. Esses nucleotídeos foram misturados em um tampão de anelamento (Tris HCl pH 7,5 10mM; NaCl 50mM e MgCl₂ 10mM) por 10 minutos a 70°C. Em seguida, foi feita a reação de síntese em tampão apropriado (HEPES pH 8,5 25mM; NaCl 125mM; MgCl₂ 5mM e DTT 1mM), os quatro desoxirribonucleotídeos, a DNA pol β e 2-5ng do DNA obtido através do protocolo de anelamento. A reação foi interrompida pela solução de parada (Formamida 95%; EDTA 20mM; Azul de Bromofenol 0,05% e Xileno Cianol 0,05%) e as amostras resolvidas em gel de acrilamida desnaturante com uréia e formamida. O gel foi exposto a filme radiográfico que após a revelação permitiu que se determinasse se houve ou não síntese de DNA.

No sistema não radioativo, o iniciador M13 -40 marcado com fluorescência foi anelado a diferentes oligonucleotídeos (**Tabela III**). O anelamento era feito em solução tampão (Tris HCl pH 7,0 10mM; NaCl 50mM e

Tabela III. Lista de iniciadores para ensaio de síntese.

Iniciador	Seqüência 5' – 3'
M13 -40	CAG CAC TGA CCC TTT TG
pT	CAA AAG GGT CAG TGC TGT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T
pA	CAA AAG GGT CAG TGC TGA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA A
pC	CAA AAG GGT CAG TGC TGC CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC C
pCA	CAA AAG GGT CAG TGC TGC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA C
pA2T	CAA AAG GGT CAG TGC TGA AAA ATT AAA AAA AAA AAA AAA A
SintM138HG	CAA AAG GGT CAGT GCT GGX ACT GGG TGT CGA AGC TCT CTA GCA TGA ^a
16-mer	CAC TGA CTG TAT GAT G
30-mer	CTC GTC AGC ATC TTC ATC ATA CAG TCA GTG

^a X representa o nucleotídeo modificado 8-oxoguanina.

EDTA 1mM) aumentando-se a temperatura até 70°C, e depois as amostras eram deixadas resfriando lentamente. As condições de síntese variavam de acordo com o experimento como descrito nos **resultados**. Após o processo de incubação para síntese, as amostras foram resolvidas em gel de acrilamida 6% desnaturante em seqüenciador automático ALF (GE Healthcare). Os fluorogramas eram analisados e a eficiência de reação era calculada pela relação entre a área do pico correspondente ao oligonucleotídeo de 40-mer e a área do correspondente ao de 16-mer.

3.14. Ensaio *in vitro* da incorporação de AZT

Foi usado também um sistema alternativo para verificar a capacidade de síntese da DNA pol β (Capp *et al.*, 2006). Nesse sistema, a reação era feita utilizando-se como molde para síntese um DNA plasmidial tratado com a DNase. Então, esse DNA foi colocado na presença do tampão de reação, dos dNTPs (na concentração de 5 μ M, exceto o dTTP) sendo o dTTP marcado com ^3H (100 μ Ci) e a DNA pol β . Foi adicionado também o AZTTP em diferentes concentrações. Após duas horas de reação, o DNA foi transferido e ligado a uma membrana, e em seguida, lavados com solução de ácido tricloroacético 0,5%. Em seguida foi adicionado o líquido de cintilação e foi feita uma leitura no aparelho β -counter.

3.15. Extratos totais, nucleares e citoplasmáticos

Para a preparação dos extratos nucleares e citoplasmáticos, cerca de 5×10^9 epimastigotas da cepa CL Brener de *T. cruzi* foram coletados por centrifugação a 1700xg a 4°C, em seguida, lavados com 1x PBS e novamente centrifugados. Os parasitos foram solubilizados em tampão A gelado (Tris HCl pH 7,4 10mM; MgCl₂ 2mM; EDTA 1mM; KCl 5mM; CaCl₂ 2mM; Espermidina 1mM e PEG-6000 6%) e foram mantidas no gelo por 10 minutos. Ao final, as células eram examinadas ao microscópio para verificar se elas estavam turgidas. Foram adicionados NP-40 (0,5% na concentração final) e Triton X-100 (0,4% na concentração final) e foi feita uma homogeneização dessas amostras.

Uma alíquota foi retirada, concentrada a vácuo e foi adicionado o mesmo volume de 2x tampão SDS "gel-loading" (Tris HCl pH 6.8 100mM; DTT 200mM; SDS ; azul de bromofenol 0,2% e glicerol 20%) correspondente a fração total. Uma alíquota também era retirada para exame ao microscópio para se verificar se a lise ocorreu. No restante das amostras, era adicionado 2x tampão B gelado (sucrose 0,64M; Tris HCl pH 7,5 40mM; Espermidina 1mM, EDTA 1mM, KCl 60mM e DTT 0,5mM) e, imediatamente, essas amostras eram centrifugadas a velocidade de 1700xg por 15 min. O sobrenadante era coletado, concentrado a vácuo e era adicionado o mesmo volume de 2x tampão SDS "gel-loading". Essa fração é a fração citoplasmática. O material precipitado pela centrifugação era lavado em 1x tampão B e, novamente, centrifugado. O precipitado era então solubilizado em 1x tampão B e era adicionado o mesmo volume de 2x tampão SDS "gel-loading". Essa fração é a nuclear.

3.16. "Western Blot"

Os extratos foram separados em gel de acrilamida 10% segundo Sambrook e colaboradores (1989). Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare). A membrana foi bloqueada em PBS 1x, Tween 0,02% (PBS-t) e leite desnatado 5% por uma hora. A membrana foi lavada duas vezes por 10 minutos em PBS-t e o anticorpo primário foi diluído 400 vezes em PBS-t e incubado durante a noite. No dia seguinte, a membrana foi lavada três vezes por 10 minutos em PBS-t e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina (AP) durante 1 hora. Foram feitas três lavagens de 10 minutos. A revelação era feita na própria membrana em tampão AP (Tris HCl pH 9,5 100mM, NaCl 100mM e MgCl₂ 5mM) e em seguida a membrana foi revelada com método colorimétrico utilizado 5-bromo-4-cloro-3-indolil/nitro blue tetrazolium (BCIP 167µg/mL e NBT330µg/mL).

O soro imune foi produzido em uma coelha através de quatro imunizações. Na primeira delas, a proteína de fusão MBP-DNA pol β foi

misturada o adjuvante completo de Freud. Nas outras três, foi utilizado o adjuvante incompleto de Freud.

3.17. RT-PCR em tempo real

RNA total de *T. cruzi*, cerca de 1µg, quantificado por eletroforese de capilaridade (RNA 6000 nanochips kit, Agilent) foram utilizado em reações de síntese da primeira fita do cDNA com o “kit” SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) e iniciadores dT(12-18) seguindo-se instruções do fabricante. As reações controle eram executadas sem a transcriptase reversa para determinação de DNA contaminante nas amostras de RNA. Os níveis de expressão do gene *TcRad51* foi determinado pela PCR em tempo real usando o produto de síntese de cDNA como molde das reações no aparato para PCR em tempo real (ABI7900 – Applied Biosystems). As reações eram feitas utilizando-se a mistura de reagentes SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) com 0,25µM de cada iniciador (TcRad51.10, ATGAACACCCGCTCCAAG e Tcr51.31, GCGGATGAACCCATT). Primeiro, a ampUNG era ativada a 50°C por 5 minutos e, depois, inativada a 95°C por 10 minutos. Esse passo também ativa a TaqGOLD polimerase. Em seguida, eram feitos 40 ciclos a 60°C e 95°C por 1 minuto cada. Para normalização, foi utilizado o gene da GAPDH que é constitutivamente expresso. Todas as amostras eram feitas em duplicadas em dois experimentos independentes. Para a determinação da quantidade relativa do gene *TcRad51*, o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi feito como descrito em Ingham e colaboradores (2001).

3.18. Sobrevivência de cepas do *T. cruzi* na presença de AZT

Para verificar a sobrevivência do *T. cruzi* na presença de AZT, as cepas JG, Colombiana e CL Brener foram contadas e, em seguida, diluídas para a concentração de 1×10^6 células/mL. Em 2mL de cultura LIT, foi adicionado AZTMP nas concentrações de 100, 200 e 300µM. Foi feito um controle sem adição de AZTMP. Após cinco dias, as células foram contadas novamente.

3.19. Sobrevivência e crescimento de cepas do *T. cruzi* após irradiação γ .

Para verificar a sobrevivência do *T. cruzi* após a irradiação γ , as cepas JG, Colombiana e CL Brener foram contadas e $2,5 \times 10^8$ células foram submetidas ou não a 500 e 1000Gy de irradiação. Após cinco dias, as células foram contadas novamente. Para verificar o efeito da radiação γ no crescimento da cepa CL Brener de *T. cruzi*, epimastigotas foram contadas e diluídas para a concentração de $2,0 \times 10^7$ células/mL. Um grupo de células foi, então, submetido a 500Gy de irradiação. As células eram contadas de 48 em 48 horas em eritrocina 4% em 1x PBS.

4. Resultados

Como descrito em dissertação de mestrado (Regis-da-Silva, 2002), o gene *Rad51* de *T. cruzi* foi parcialmente caracterizado. Em tal trabalho, clonamos o gene *TcRad51*. Verificamos a presença de seu RNA mensageiro em todas as formas do parasito e que os níveis desse RNA na forma amastigota eram mais elevados. O gene *TcRad51* foi também clonado em plasmídeo de levedura e utilizado em ensaios de complementação funcional em *Saccharomyces cerevisiae*. Posteriormente, outros experimentos foram feitos para melhor entender a sua participação no metabolismo de DNA *T. cruzi*.

4.1. Ensaio de Recombinação em CHO utilizando o gene *Rad51*

Uma das formas de se verificar a influência de um gene no processo de recombinação é utilizando a linhagem CHO K1 DRA10 (Liang *et al.*, 1998). Essas células possuem duas seqüências inativas do gene *Neo* que confere resistência ao antibiótico neomicina bem como ao seu análogo G418. Na primeira cópia, foi inserida uma seqüência chamada I-SceI que retira o gene de fase. A segunda seqüência não possui a região 5' sendo, portanto, uma seqüência não expressa. Sendo assim, o processo de recombinação entre essas duas cópias poderia permitir a ativação de um desses genes e conseqüentemente um fenótipo de resistência a neomicina. Dessa forma, para verificar se o gene *Rad51* de *T. cruzi* poderia aumentar a taxa de recombinação, o mesmo foi clonado no vetor pcDNA 3.1 e transfectado em CHO K1 DRA10. Os clones de células transfectados com o vetor vazio ou contendo o gene *TcRad51* foram colocados em presença de 1mg/mL de G418. O clone carregando o gene *TcRad51* apresentou um aumento significativo do número de recombinantes (**Figura 5**) mostrando que o gene *TcRad51* pode causar um aumento na taxa de recombinação assim como seus homólogos em outros organismos.

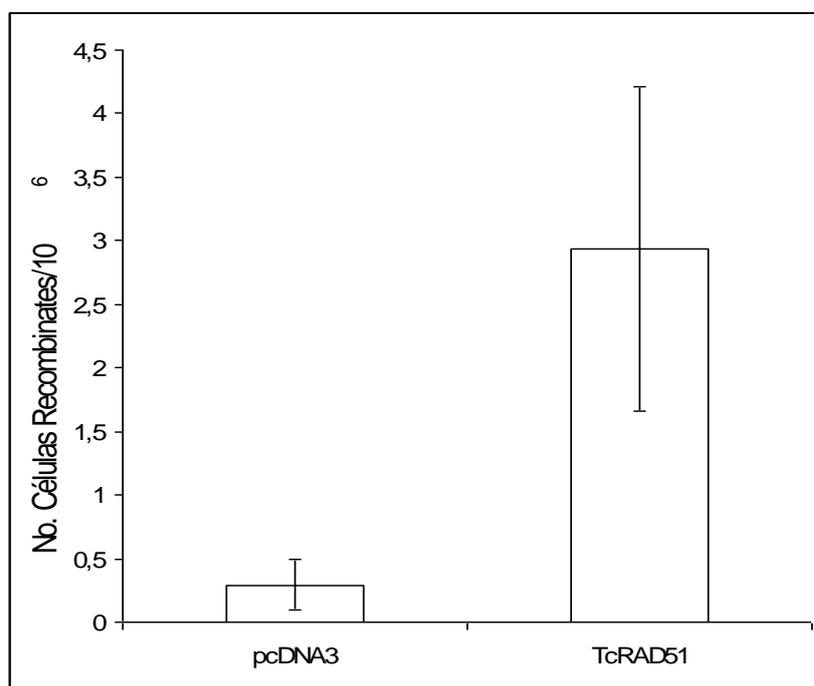


Figura 5. Ensaio de recombinação em células CHO K1 DRA10 transformadas com o vetor pcDNA3 e esse mesmo vetor carregando o gene *TcRad51*.

4.2. Resposta do *Trypanosoma cruzi* frente à radiação γ

A radiação γ , dentre outros tipos de danos, causa quebras na fita de DNA que podem ser religadas pelo reparo por recombinação homóloga caracterizado por sua alta fidelidade. Células epimastigotas de três cepas de *T. cruzi*, CL Brener, JG e Colombiana, foram submetidas a essa radiação. Interessantemente, as três cepas se mostraram muito resistentes sendo a DL₅₀ de 1000Gy (**Figura 6**). Um dos principais genes envolvidos no processo de reparo da quebras de dupla fita causadas por esse agente é o gene *Rad51*.

Para verificar se a resistência à radiação γ estava associada a uma indução da expressão do gene *Rad51*, RNA total da cepa CL Brener foi extraído de células irradiadas ou não, e cerca de 10 μ g de RNA total foi usado para transferência em membrana de náilon. Há um aumento estimado de cerca de duas vezes da quantidade de mRNA para o gene de *T. cruzi* quando irradiado a 500Gy se comparado ao não irradiado (**Figura 7**). Os RNAs ribossômicos 18S, 24S α e 24S β indicam que aproximadamente a mesma quantidade de RNA total foi utilizadas para ambas amostras. Além disso, também foi feita a RT-PCR em tempo real de amostras irradiadas com 500Gy e não. Considerando-se as quantidades relativas ao mRNA do gene de GAPDH, há um aumento de quatro vezes nos níveis de mRNA para o gene *TcRad51* quatro horas após a irradiação. E mesmo 24 horas após a irradiação, o nível desse mRNA é duas vezes maior nas células irradiadas.

A técnica PFGE permite visualizar o padrão de bandas cromossômicas do *T. cruzi* em gel de agarose. A radiação γ , por causar quebras na dupla fita de DNA, pode alterar esse padrão. Assim, parasitos que sofreram irradiação tiveram suas bandas cromossômicas examinadas através da PFGE. As células não irradiadas apresentam um padrão de bandas compatível com o já descrito para *T. cruzi* (Cano *et al.*, 1995). Já o padrão das células irradiadas apresentou-se no gel sob a forma de um rastro de DNA após a irradiação (**Figura 8**). A formação desse rastro é um indicativo que os cromossomos desse parasito sofreram várias quebras gerando a perda das bandas cromossômicas. O reparo das quebras de dupla-fita é evidenciado pelo restabelecimento do padrão de bandas normal 48 horas após a irradiação.

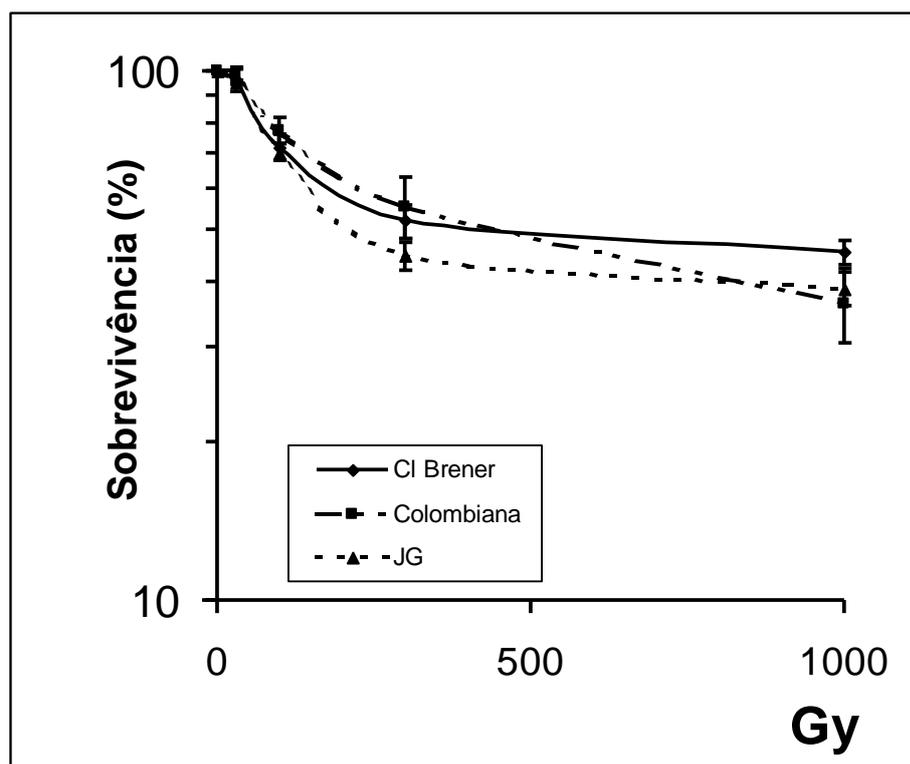


Figura 6. Curva de sobrevivência à radiação ionizante. Células de diferentes cepas de *T. cruzi* foram expostas a diferentes doses de radiação ionizante e após cinco dias, as células sobreviventes foram contadas. Os valores são referentes a triplicatas.

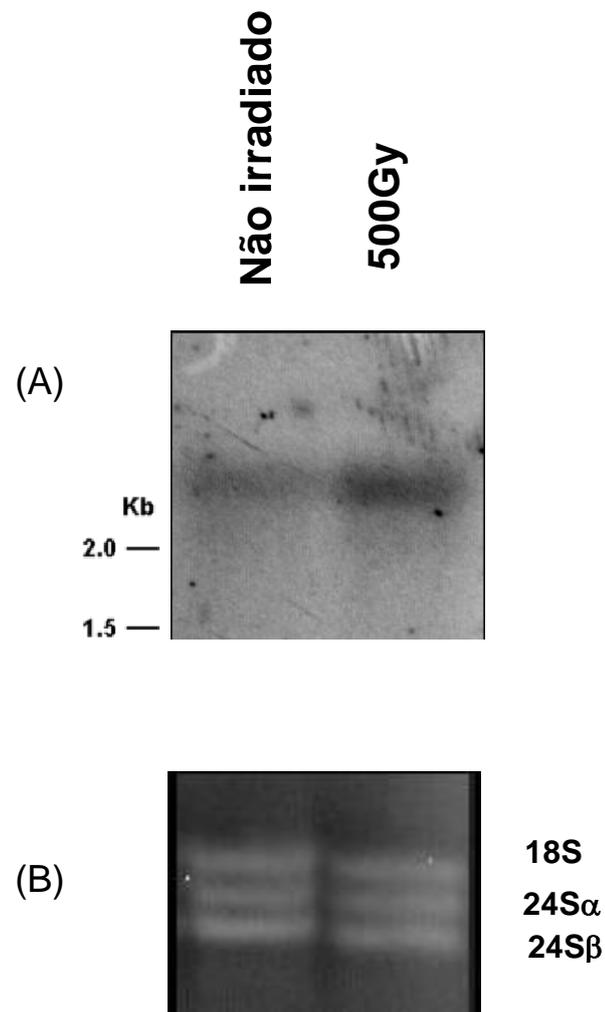


Figura 7. (A) Northern blot utilizando como sonda o gene *TcRad51*. Foram utilizados os RNAs totais de células irradiadas com 500Gy ou não. **(B)** Estimativa da quantidade de RNA através do gel de agarose utilizando os RNAs ribossômicos 18S, 24S α e 24S β .

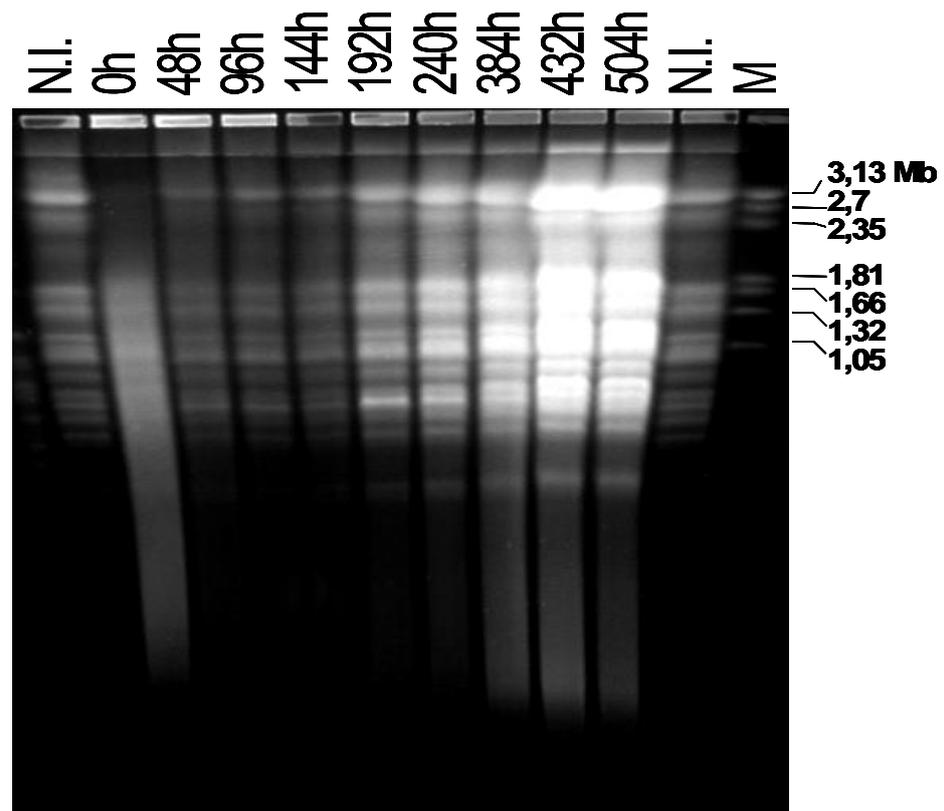


Figura 8. Resposta do *T. cruzi* frente à radiação γ . Gel de Agarose LMP 1% onde foram resolvidas, por PFGE, amostras da cepa CL Brener obtidas vários tempos após a irradiação. N.I. representa o não irradiado enquanto M representa um marcador de peso molecular.

Análise do padrão de bandas foi feita também 6, 24, 30 e 48 horas após a irradiação e, mais uma vez, a reconstituição cromossômica só foi detectada depois de 48 horas (**Figura 9**). Interessantemente, o parasito irradiado só inicia seu crescimento 320 horas após a irradiação ao passo que o parasito não irradiado cresce normalmente (**Figura 10**). Esse aumento na fase “lag” de crescimento indica o tempo necessário para que o mesmo não só repare o seu material genético, mas também restabeleça todas as suas funções celulares afetadas pelo processo de irradiação para que possa, então, se reproduzir.

Um segundo gene relacionado ao metabolismo de DNA estudado codifica a DNA polimerase β . Embora, seu produto tenha sido extensivamente estudado em mamíferos, pouco se conhece a respeito do seu papel na biologia de parasitos como o *Trypanosoma cruzi*. Dada a sua já conhecida importância em células eucarióticas, é interessante se conhecer a contribuição do mesmo para a integridade genômica do *T. cruzi*.

4.5. Clonagem do gene da DNA pol β do *T. cruzi*

Com o objetivo de clonar o gene da TcDNA pol β , a seqüência do gene DNA pol β de *Crithidia fasciculata* foi utilizada para fazer uma pesquisa no banco de dados de ESTs (dbEST) com o programa blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) que revelou uma única EST de *T. cruzi*. Essa EST, identificada pelo ID AW330432, possui 86% de identidade em relação à seqüência de *C. fasciculata*. O tamanho total da EST é de 585 nucleotídeos sendo essa seqüência gerada a partir de uma biblioteca normalizada de cDNA de epimastigotas da cepa CL Brener. A seqüência classificada como sendo de alta qualidade foi utilizada para fazer uma nova busca no banco de dados de ESTs através do programa blastn. O resultado da pesquisa revelou a presença de duas ESTs com homologia significativa sendo uma delas a própria EST utilizada na pesquisa. Essa nova EST apresenta 370 nucleotídeos e está identificada pelo ID AW330431. Análise dessa EST mostrou que ela apresentava a região 5' do gene, permitindo a construção de iniciadores a partir do ATG inicial. Para a construção de um iniciador para a

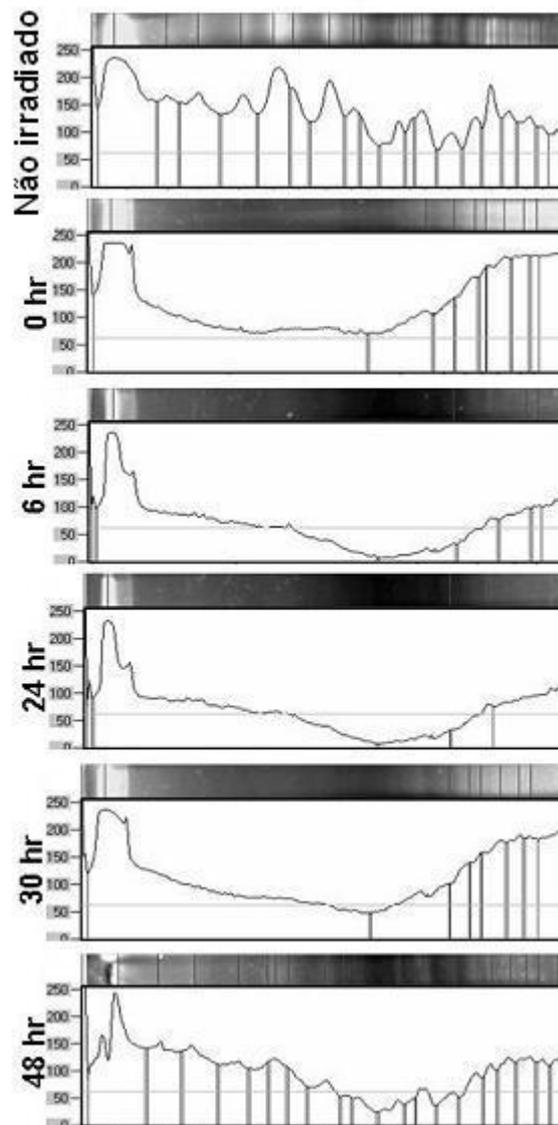


Figura 9. Análise do padrão de bandas cromossômicas de *T. cruzi* em diferentes tempos após exposição à radiação γ . A figura de cima representa a canaleta do gel de agarose corado pelo brometo de etídeo onde as amostras foram resolvidas por PFGE. Em baixo, está a representação densitométrica das bandas detectadas.

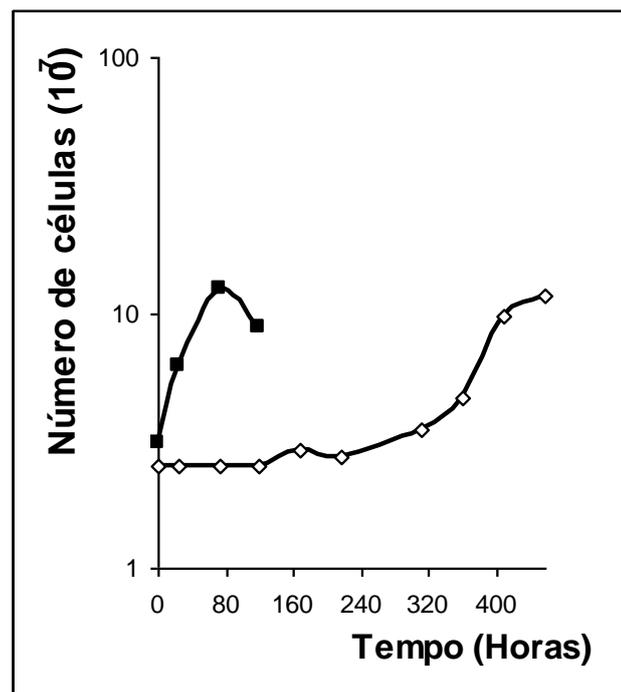


Figura 10. Curva de crescimento da cepa CL Brener de *T. cruzi*. Células, irradiadas ou não, foram mantidas em cultura e contadas de 48 em 48 horas. O quadrado representa as células não irradiadas e o losango, as células expostas a 500Gy de radiação γ .

região 3', as seqüências de proteína da DNA pol β de *C. fasciculata* e *L. infantum* foram usadas em um alinhamento e, a partir de um consenso, foram construídos iniciadores degenerados. A PCR feita com esses iniciadores e DNA genômico da cepa Tulahuén produziu a amplificação de um fragmento de cerca de 1200pb, correspondente a região codificadora completa do gene. O fragmento foi ligado no plasmídeo pCR 2.1 (Invitrogen). Os plasmídeos purificados após a clonagem foram seqüenciados, o que revelou uma seqüência de 1209 pb correspondente a uma proteína de 402 resíduos de aminoácidos. Essa seqüência tem 53% de resíduos similares em relação à seqüência de DNA pol β humana e 33% de resíduos idênticos (**Figura 11**). E em relação à seqüência de rato, ela possui 52% de resíduos similares e 32% de resíduos idênticos (**Figura 11**). A seqüência de proteína foi usada em um alinhamento com as seqüências de *T. brucei* (88% de resíduos similares e 80% de idênticos), *L. infantum* (69% de similares e 76% de idênticos), *L. major* (69% de similares e 77% de idênticos) e *C. fasciculata* (69% de similares e 77% de idênticos) (**Figura 12**). Essas proteínas são altamente conservadas dentro do grupo dos tripanossomatídeos como mostra a seqüência consenso. As proteínas de *T. brucei* e de *T. cruzi* possuem inserções na região C-terminal. Essas inserções não são conservadas entre esses dois organismos e tem tamanhos diferentes, embora sejam conservadas entre as cepas de *T. cruzi*. Por outro lado, esses dois parasitos possuem uma deleção de cerca de cinco resíduos de aminoácidos na região central da proteína correspondendo aos resíduos de 255 a 260 de *L. major*, *L. infantum* e *C. fasciculata*. Esses resíduos são conservados nos outros três tripanossomatídeos. Essas seqüências possuem ainda 27 resíduos de aminoácidos que são conservados na família das DNA pol β . Entretanto, na posição do resíduo 368, os alelos das cepas de *T. cruzi*, possuem uma substituição de uma tirosina por uma fenilalanina.

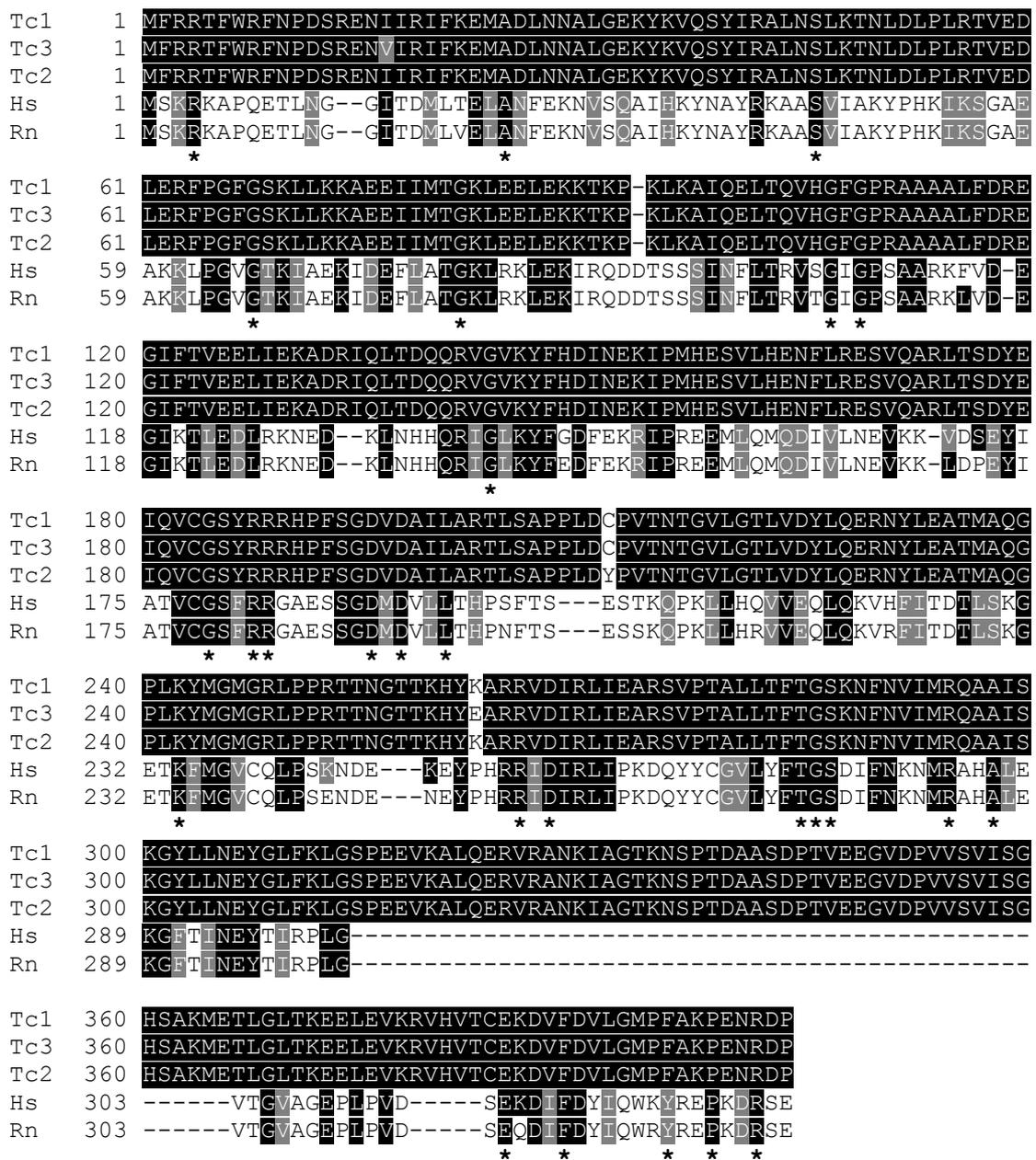


Figura 11. Alinhamento das seqüências das proteínas DNA pol β de *Trypanosoma cruzi* (Tc), *Rattus norvegicus* (Rn; Número de acesso no sítio do NCBI, AAH98668) e *Homo sapiens* (Hs, Numero de acesso, AAI00289). Tc1 e Tc2 referem-se aos alelos da cepa CL Brener de *T. cruzi* (Números de acesso, XP_819968 e XP_813738) e Tc3, da cepa Tulahuén. Os asteriscos, embaixo, representam 27 resíduos que são conservados na família das DNA pol β . O alinhamento foi feito utilizando o programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

Tc1	1	MFRRTFWRFNPD	SRENIIRIF	KEMADLNNALGEKYKVQSY	IRALNS	SLKTNLDLPLRTVED
Tc3	1	MFRRTFWRFNPD	SRENIIRIF	KEMADLNNALGEKYKVQSY	IRALNS	SLKTNLDLPLRTVED
Tc2	1	MFRRTFWRFNPD	SRENIIRIF	KEMADLNNALGEKYKVQSY	IRALNS	SLKTNLDLPLRTVED
Tb	1	MLRRTFFRLSLDN	RENIIRIF	TEMADLNNALGEKYKVQSY	NRAVRS	SLKTHLDLPLRTVED
Li	1	MLRRKFLRR--	DHRENIIRIF	QEMADLNNALGEKYKVS	SYHRSIE	SLKTNLDKPLNTPQD
Lm	1	MLRRTFLRR--	DHRENIIRIF	QEMADLNNALGEKYKVS	SYHRSIE	SLKTNLDKPLNTPQD
Cf	1	MFRRTFLTR--	GHRENIIRIF	QEMADLNNALGEKYKVS	SYLRSIE	SLKTNLDKPLNTPQD
		*		*		*
Tc1	61	LERFPGFGSKLLKKAEEI	IMTGKLEELEKKT	KPKLKAIQELTQVHGFG	PRAAAALFDREG	
Tc3	61	LERFPGFGSKLLKKAEEI	IMTGKLEELEKKT	KPKLKAIQELTQVHGFG	PRAAAALFDREG	
Tc2	61	LERFPGFGSKLLKKAEEI	IMTGKLEELEKKT	KPKLKAIQELTQVHGFG	PRAAAALFDREG	
Tb	61	LEKFGIGSKLLKKAEEI	IRTGKLEDELEKKT	KPKLKAIQELTQIHGFG	PRAAAALFDREG	
Li	59	LKAFSGFGAKLLKKAEEI	MATGKLEEL	ESKTKPKLKAIQELTQVHGFG	PRAAAALFDREG	
Lm	59	LKAFSGFGIKLLKKAEEI	MATGKLEEL	ESKTKPKLKAIQELTQVHGFG	PRAAAALFDREG	
Cf	59	LKAFSGFGAKLLKKAEEI	MATGKLEEL	ESKTKPKLKAIQELTQVHGFG	PRAAAALFDREG	
		*	*		**	
Tc1	121	IFTVEELIEKADRIQ	-LTDQQRVGK	YFHDINEKIPMHES	SVLHENFLRE	SVQARLITSDYE
Tc3	121	IFTVEELIEKADRIQ	-LTDQQRVGK	YFHDINEKIPMHES	SVLHENFLRE	SVQARLITSDYE
Tc2	121	IFTVEELIEKADRIQ	-LTDQQRVGK	YFHDINEKIPMHES	SVLHENFLRE	SVQARLITSDYE
Tb	121	IFTVEDLIEKADQIQ	-LTFQQRVGR	YFHDINEKIPMHES	ILHENFLRE	CARLRRLGSDYE
Li	119	IFTVDELLQKADSI	PSLTDQQRVGI	KYFYDINEKIPMQ	ESVLHENYLRE	KCMEVLGKDFIS
Lm	119	IFTVDELLQKADSI	PSLTDQQRVGI	KYFYDINEKIPMQ	ESVLHENYLRE	KCMEVLGKDFIS
Cf	119	IFTVEELQKADSI	SSLTDQQRVGI	KYFYDINEKIPMQ	ESVLHENYLRE	KCLEVLGKDYT
			*			
Tc1	180	IQVCGSYRRRH	PFSGVDAILARTLS	SAPPLDCPVTNT	TGVLGLVDYDLOER	NYLEATMAQG
Tc3	180	IQVCGSYRRRH	PFSGVDAILARTLS	SAPPLDCPVTNT	TGVLGLVDYDLOER	NYLEATMAQG
Tc2	180	IQVCGSYRRRH	PFSGVDAILARTLS	SAPPLDY	PVTNTGVLGLVDYDLOER	NYLEATMAQG
Tb	180	IQICGSYRRRH	PFSGDIDAILARS	LNAPPLDAPVTT	TGVLITILVEYLQEQRY	LEATMALG
Li	179	ILICGSYRRRH	PFSGVDAILSRTL	DAPPLSE	PVAATGVLGHFVEFLE	SLKYLEATMAQG
Lm	179	ILICGSYRRRH	PFSGVDAILSRTL	DAPPLSE	PVAATGVLGHFVEFLE	SLKYLEATMAQG
Cf	179	IAICGSYRRRH	PFSGVDALLSRTH	DAPPLSE	PVAATGVLGNV	VEHLEKTNYLEATMAQG
		*	**	*	*	*
Tc1	240	PLKYMGMGRLPPRTT	NG-----	TKKHYKARRVD	IRLIEARSVPTALL	TFTGSKNFNVMIR
Tc3	240	PLKYMGMGRLPPRTT	NG-----	TKKHYEARRVD	IRLIEARSVPTALL	TFTGSKNFNVMIR
Tc2	240	PLKYMGMGRLPPRTT	NG-----	TKKHYKARRVD	IRLIEARSVPTALL	TFTGSKNFNVMIR
Tb	240	PLKYMGMGRLPPRTT	GG-----	ATKTYKARRVD	IRLIEKSVPTALL	TFTGSKNFNVMIR
Li	239	PLKYMGMGRLPPRI	VRDKAGRENTK	VYKARRVDIRL	IETKSVPTAMLT	TFTGSKNFNVMIR
Lm	239	PLKYMGMGRLPPRI	VRDKAGRENTK	VYKARRVDIRL	IETKSVPTAMLT	TFTGSKNFNVMIR
Cf	239	PLKYMGMGRLPPRI	VRDKAGRENTK	VYKARRVDIRL	IETKSVPTAMLT	TFTGSKNFNVMIR
		*		**		***
Tc1	295	QAATSKGYLLNEYGL	FKLGSPEEVKALQ	ERVRANKIAGTKNS	----PTDAAS	DPTVEEGV
Tc3	295	QAATSKGYLLNEYGL	FKLGSPEEVKALQ	ERVRANKIAGTKNS	----PTDAAS	DPTVEEGV
Tc2	295	QAATSKGYLLNEYGL	FKLGSPEEVKALQ	ERVRANKIAGTKNS	----PTDAAS	DPTVEEGV
Tb	295	QAATSKGYLLNEYGL	FKVGTSEVVRVLO	ERVRARKAAGLSKS	QMKQEDPYS	SSSVTEEGA
Li	299	QAATSKGYLLNEYGL	FKLGTPEEARALY	ERIGIRGKNAG	-----	-----
Lm	299	QAATSKGYLLNEYGL	FKLGTPEEARALY	ERIGIRGKNAG	-----	-----
Cf	299	QAATAKGYLLNEYGL	FRLGTPEEARALY	ERVGIKGNAG	-----	-----
		*				
Tc1	351	DPVSVVISGHS	SAKMETLGLTKEE	LEVKRVHVTCEK	DVFDVLGMPFAK	PENRDP
Tc3	351	DPVSVVISGHS	SAKMETLGLTKEE	LEVKRVHVTCEK	DVFDVLGMPFAK	PENRDP
Tc2	351	DPVSVVISGHS	SAKMETLGLTKEE	LEVKRVHVTCEK	DVFDVLGMPFAK	PENRDP
Tb	355	EPFVSSISGNS	SAKMETLGMTKEE	LEAKRVHVTCEK	DVFDVLGMPYAK	PENRDP
Li	338	-----	EELGVPKDELED	KRVEVRSEQD	VFDVLGMPYAK	PENRDP
Lm	338	-----	EELGVPKDELED	KRVEVRSEQD	VFDVLGMPYAK	PENRDP
Cf	338	-----	EELGVPKDELED	KRVDVRSEQD	VFDALGMPYAK	PENRDP
				*	*	**

Legenda ao lado.

Figura 12. Alinhamento das seqüências das proteínas DNA pol β de tripanossomatídeos. Tc1 e Tc2 referem-se aos alelos da cepa CL Brener de *T. cruzi* (Números de acesso no sítio do NCBI, XP_819968 e XP_813738) e Tc3, da cepa Tulahuén. Tb se refere a *T. brucei* (Número de acesso, AAQ56191); Lm, *L. major* (Número de acesso, CAJ02268); Li, *L. infantum* (Número de acesso, AAF00495) e Cf, *C. fasciculata* (Número de acesso, AAQ68599). Os asteriscos, embaixo, representam resíduos 27 resíduos que são conservados na família da DNA pol β . A seta indica o único resíduo conservado onde há uma substituição de uma tirosina por uma fenilalanina. O alinhamento foi feito utilizando o programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

4.6. Expressão da TcDNA pol β em *E. coli*

A produção da proteína TcDNA pol β permite se fazer ensaios funcionais *in vitro*. A proteína pode também ser utilizada na imunização de animais para a produção de anticorpos. Com esses objetivos, o gene da TcDNA pol β foi clonado no plasmídeo pMAL e, em seguida, transformado em *E. coli*. A proteína de fusão tem um tamanho teórico de 87kDa. A TcDNA pol β foi produzida em grandes quantidades (**Figura 13a**). Entretanto, após a lise das bactérias, a maior parte dessa proteína permanecia na fração insolúvel, provavelmente sob a forma de corpúsculos de inclusão. Dois protocolos de solubilização de proteínas foram usados. O primeiro utilizava uréia como desnaturante. Uma grande quantidade de proteína era solubilizada. Entretanto, após a diálise, essa proteína não se ligava a coluna de amilose. No segundo protocolo, foi utilizado o detergente sarcosil. Mais uma vez, a proteína era solubilizada em grande quantidade. Foi possível se purificar a proteína em coluna de amilose. Essa proteína pode ser utilizada na imunização do coelho. Todavia, ela não mostrava atividade *in vitro*.

Embora a maior parte da proteína estivesse na fração insolúvel, era possível também identificá-la na fração solúvel (**Figura 13b**). Em purificação típica utilizando essa fração, uma parte da proteína se ligava a coluna de amilose. Após a lavagem, essa proteína pôde ser eluída e, logo após, dosada pelo método de Bradford. O rendimento da purificação variava entre 4 e 6mg por litro de cultura de bactérias.

4.7. Expressão da TcDNA pol β em epimastigotas de *T. cruzi*

Para verificar a expressão de TcDNA pol β em *T. cruzi*, extratos de epimastigotas da cepa CL Brener foram resolvidos em gel de acrilamida 12% e depois transferidos para membrana de nitrocelulose que foram incubadas com anticorpos produzidos em coelho contra a DNA pol β de *T. cruzi*. Esses anticorpos foram capazes de detectar uma banda de aproximadamente 45kD (**Figura 14**, canaleta 1), que não está presente no soro pré-imune (**Figura 14**, canaleta 4). O tamanho teórico da TcDNA pol β é de aproximadamente 45,5kD.

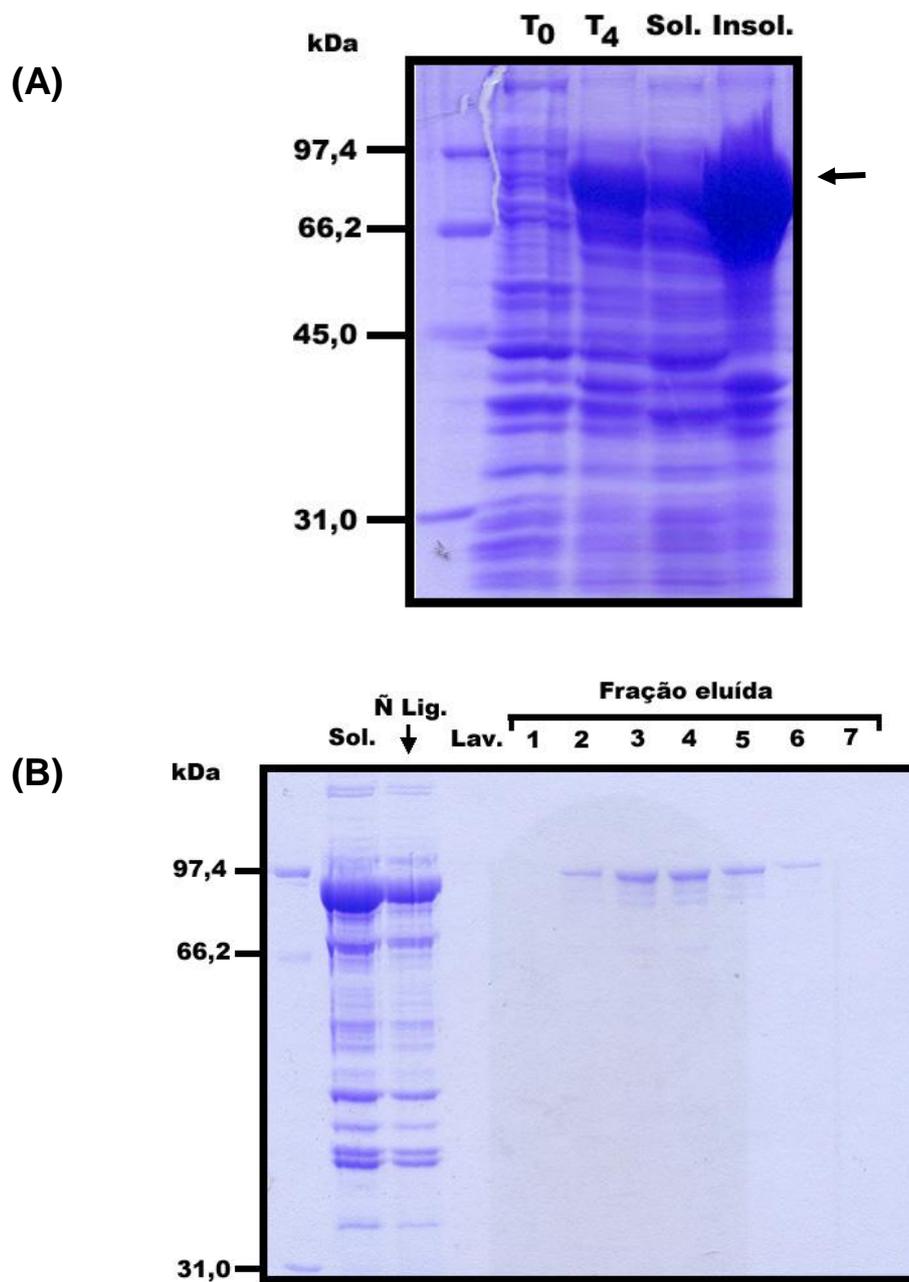


Figure 13. (A) Expressão da proteína de fusão MBP-TcDNA pol β em *E. coli*. As amostras foram resolvidas em gel de acrilamida 10% com SDS. As amostras T₀ e T₄ correspondem ao tempo anterior e quatro horas após a indução respectivamente. Sol. e Insol. representam as frações solúveis e insolúveis após a lise da bactéria. **(B)** Purificação em coluna de amilose da proteína de fusão MBP-TcDNA pol β . As amostras foram resolvidas em gel de acrilamida 10% com SDS. Ñ lig. e Lav. referem-se a fração não ligada a coluna e a amostra retirada durante a lavagem respectivamente.

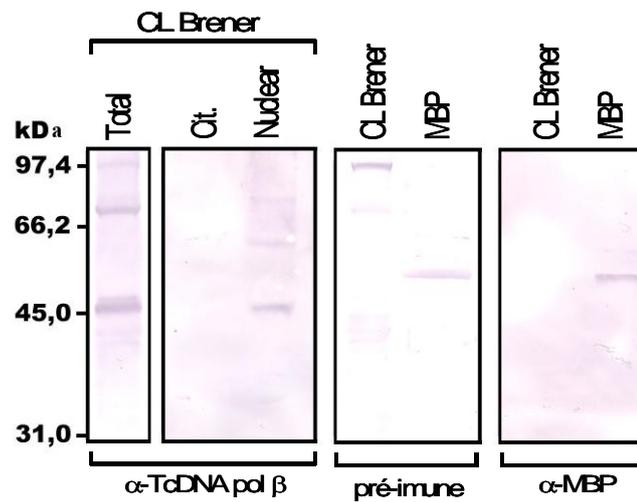


Figura 14. Western blot de extratos da cepa CL Brener de *T. cruzi*. Na canaleta 1, 2 e 3, foram utilizados extratos total, citoplasmático e nuclear respectivamente e anticorpo contra a proteína de fusão MBP-TcDNA pol β . Nas canaletas 4 e 5, foram utilizadas a proteína total e a MBP purificada respectivamente e soro pré-imune. Na canaleta 6 e 7, foram utilizados respectivamente extratos total, MBP e anticorpo contra essa proteína.

Uma vez que esses anticorpos foram produzidos utilizando uma proteína em fusão com a MBP, testamos também se anticorpos produzidos em coelho contra a MBP são capazes de detectar a TcDNA pol β em extratos de epimastigotas. Embora seja capaz de detectar a MBP (**Figura 14**, canaleta 7), os anticorpos não reagiram com proteínas do extrato que possuíam o tamanho da enzima de *T. cruzi* (**Figura 14**, canaleta 6). Os anticorpos contra TcDNA pol β foram testados em extratos nucleares (**Figura 14**, canaleta 3) e citoplasmáticos (**Figura 14**, canaleta 2) de *T. cruzi*. Ao contrário da proteína de *T. brucei* e assim como a proteína de *L. infantum*, a de *T. cruzi* parece estar na fração nuclear (**Figura 14**, canaleta 3).

4.8. Complementação funcional da bactéria SC18-12.

Para verificarmos se a homologia do gene TcDNA pol β com outras DNA polimerases também era funcional, realizamos experimentos de complementação heteróloga em bactérias. Para isso, utilizamos a cepa SC18-12 de *E. coli* que tem uma mutação no gene da DNA polimerase I que não permite o crescimento da bactéria a 42°C. Além disso, ela possui uma mutação no gene da proteína UvrA, que a torna sensível a luz U.V. Células eletrocompetentes dessa cepa foram transformadas com o plasmídeo pMAL carregando o gene da DNA polimerase β e o mesmo vetor vazio. Como controle, a cepa AB1157, selvagem para os genes da DNA polimerase I e uvrA, foi também transformada por eletroporação com o plasmídeo pMAL. A superexpressão da DNA pol β nas células SC18-12 restauram a habilidade das mesmas em crescer a temperatura de 42°C (**Figura 15a**). Interessantemente, a DNA pol β também foi capaz de permitir o crescimento dessas células após a irradiação com luz U.V. (**Figura 15b**) Nesse caso, é provável que essa enzima tenha atividade de síntese translesão, ou seja, ela é capaz de sintetizar tendo como molde DNA lesionado pela luz U.V.

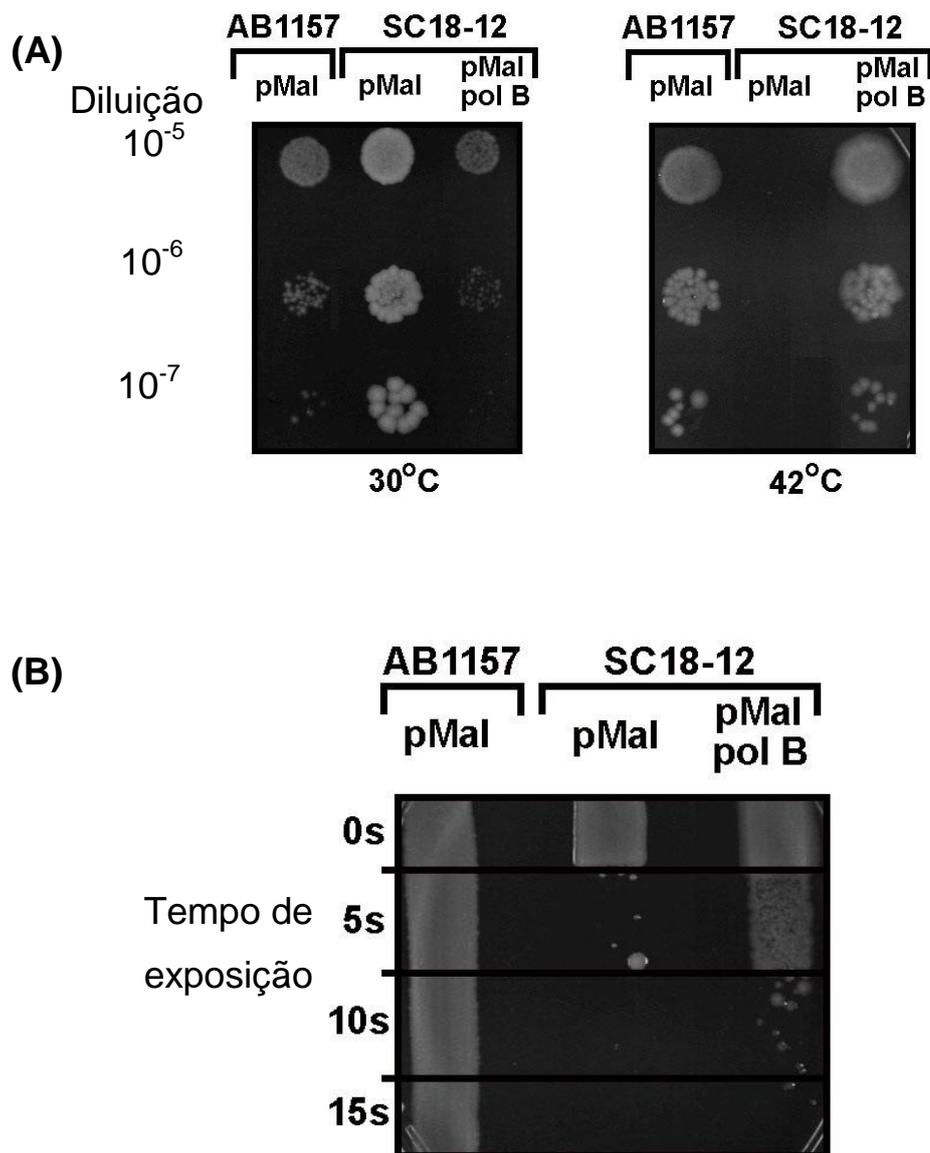


Figure 15. Complementação da cepa SC18-12 de *E. coli*. **(A)** Crescimento da cepa a 30°C e 42°C. A cepa selvagem AB1157 tem um crescimento normal em ambas as temperaturas enquanto que a cepa *polA*⁻ cresce a 30°C e a 42°C apenas quando possui o gene da DNA pol β . **(B)** Crescimento da cepa após irradiação com luz U.V. Apenas a cepa selvagem e a cepa SC18-12 transformada com plasmídeo contendo o gene *DNA pol β* são capazes de crescer após o tratamento com U.V.

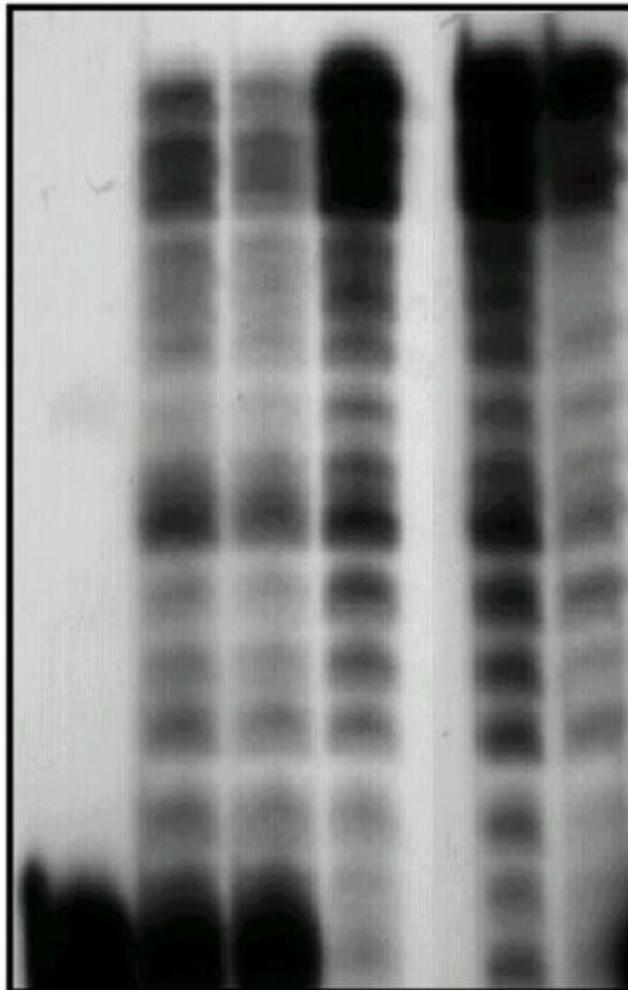
4.9. Síntese *in vitro* de DNA

Uma vez que a TcDNA pol β era capaz de realizar síntese *in vivo*, a proteína purificada de *T. cruzi* foi usada para realizar a reação de síntese *in vitro* que consiste em incubar essa proteína na presença dos quatro nucleotídeos e um iniciador de 16 bases anelado a um oligonucleotídeo de 30 bases. A TcDNA pol β foi capaz de sintetizar DNA como pode ser observado pelo aparecimento de uma banda 30 pares de base (**Figura 16**). Além disso, ela é uma enzima de baixa processividade uma vez que insere apenas uns poucos nucleotídeos por vez. Isso pode ser evidenciado pelo fato de aparecerem sinais correspondentes a todos os tamanhos de 16 a 30 bases. A baixa processividade é uma característica desse grupo de proteínas como já visto para DNA pol β de outros organismos.

4.10. Incorporação de AZT *in vitro* e *in vivo*

Nakajima-Shimada e Aoki (1998) mostraram que a forma amastigota do *T. cruzi* é sensível ao tratamento com o AZT, entretanto não foi identificada qual a enzima responsável pela incorporação desse análogo de base. Para verificarmos se a TcDNA pol β poderia estar fazendo esse papel, foi feito um ensaio de síntese de DNA que mede a incorporação de timidina tritiada ao DNA. Nesse ensaio, um DNA plasmidial é tratado com DNase de forma que ele passa a ter uma série de falhas onde poderá ocorrer a síntese de DNA. A esse DNA são adicionados os dNTPs e a TcDNA pol β . Para avaliar a incorporação de AZT, várias concentrações desse fármaco foram adicionadas. Há uma diminuição na incorporação de timidina tritiada quando é adicionado AZT nas concentrações de 10 e 100 μ M indicando que o mesmo foi utilizado como substrato da síntese, inibindo tal processo (**Figura 17**). Isso sugere que a TcDNA pol β pode, portanto, ser uma das enzimas responsáveis pela inibição do crescimento do parasito *T. cruzi* na presença de AZT. Não há incorporação de timidina tritiada quando se utiliza a MBP no mesmo experimento, indicando que o sistema de purificação não possui proteínas contaminantes capazes de incorporar timidina ao DNA.

3' GTGCAGTCGTAGAAGTA 5'
 5' CTCGTCAGCATCTTCATCATAACAGTCAGTG 3'



TcDNA pol b (ug)	-	0,2	0,4	1	2	4
MBP (ug)	4	-	-	-	-	-

Figura 16. Síntese *in vitro* de DNA pela TcDNA pol β em fusão com MBP. As amostras eram compostas por um iniciador de 16 bases anelado a um molde de 30 bases e foram incubadas na ausência ou presença de diferentes concentrações de TcDNA pol β a 37°C por 2 horas. A análise foi feita em gel de acrilamida 6%.

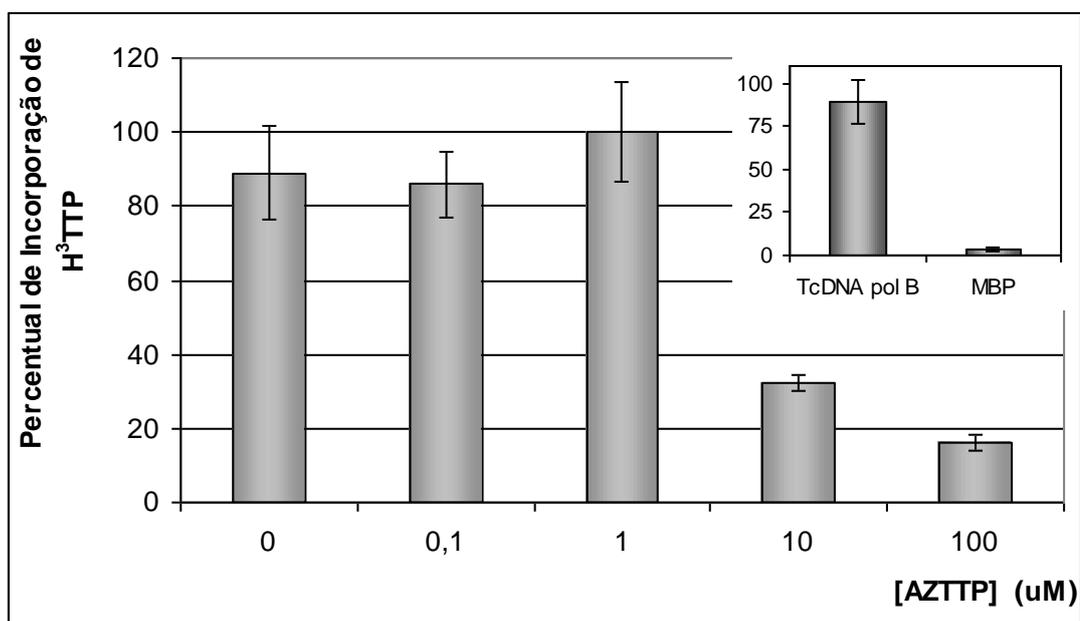


Figura 17. Percentual de incorporação de ³H-dTTP na presença de diferentes concentrações de AZT. O gráfico no canto superior direito indica o percentual de incorporação de H³-dTTP pela TcDNA pol β e MBP.

Uma vez que a DNA pol β de *T. cruzi* é capaz de incorporar o nucleotídeo trifosfato modificado AZT, decidimos verificar qual a toxicidade também para as formas epimastigotas desse parasito. Para isso, foram adicionadas diferentes concentrações de AZT a culturas de epimastigotas de três cepas de *Trypanosoma cruzi* (JG, Colombiana e CL Brener). O AZT foi capaz de provocar uma inibição do crescimento de todas as cepas, sendo que a cepa JG apresentou uma inibição mais acentuada a partir da concentração de 200 μ M (**Figura 18**).

4.11. Caracterização das condições ótimas de atividade da TcDNA pol β

As condições ótimas de atuação da TcDNA pol β foram testadas em um sistema que utiliza fluorescência. Nesse sistema, o iniciador da reação marcado com fluoresceína foi anelado ao oligonucleotídeo pT (**Tabela III, Material e Métodos**) e incubado na presença dessa proteína. Em seguida as amostras foram resolvidas em gel desnaturante de acrilamida 6% no seqüenciador automático ALF. Nesse caso, os resultados aparecem como picos em um fluorograma (**Figura 19**), e as áreas sob os mesmo representam a medida da sua intensidade. Dessa forma, a atividade da DNA pol β pode ser medida pela relação entre a área do pico de 40-mer que representa o máximo de polimerização possível e o pico de 17-mer que representa a ausência completa de polimerização. Assim, foi avaliada a influência da concentração de NaCl, MgCl₂, dNTPs, temperatura, pH e tempo de reação. Para o estabelecimento da reação, as seguintes condições foram mantidas: 10mM de MgCl₂, Tris HCl pH 7,4 50mM, 37°C, 100mM de cada dNTP, duas horas de reação e sem adição de NaCl.

A processividade das polimerases também pode ser analisada utilizando esse sistema. Assim, podemos confirmar os resultados obtidos no sistema de síntese utilizando radioativo. A TcDNA pol β foi capaz de fazer a extensão completa do iniciador ligado ao molde pT (**Figura 19**, canaleta 3). Entretanto, a presença de picos intermediários indica a baixa processividade da TcDNA pol β . Por outro lado, a Klenow que é uma enzima de alta processividade não

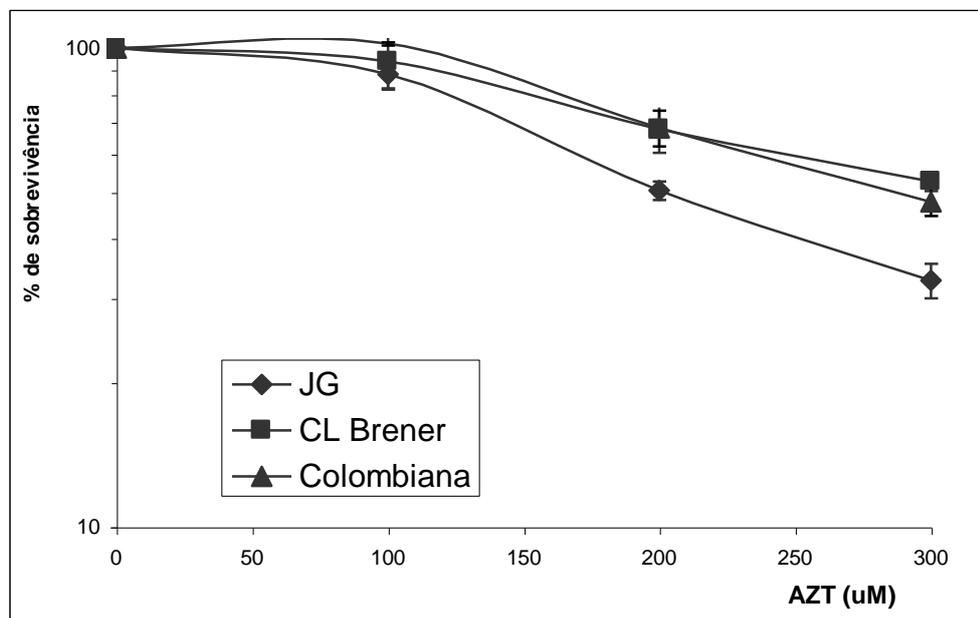


Figura 18. Crescimento do *T. cruzi* na presença de AZTMP. Culturas de epimastigotas de diferentes cepas de *T. cruzi* foram expostas a diferentes concentrações de AZTMP e após cinco dias, as células sobreviventes foram contadas.

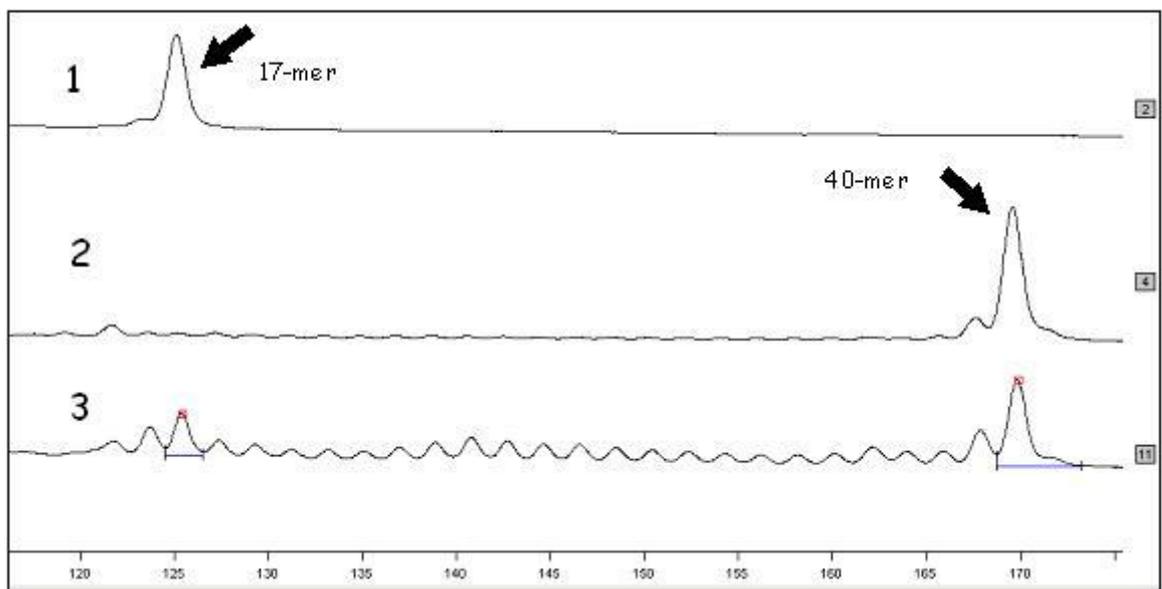


Figura 19. Fluorograma das reações de síntese. Na canaleta 1, a amostra não possui nenhuma proteína, a seta indica o pico que corresponde ao iniciador (17-mer). Na canaleta 2, a reação de polimerização utilizando a Klenow (Invitrogen), a seta indica o pico que corresponde ao máximo de polimerização (40-mer). Na canaleta 3, a reação de polimerização feita pela DNA pol β .

apresenta tais picos intermediários (**Figura 19**, canaleta 2).

Para analisar a concentração de NaCl, as concentrações adicionadas variaram de 0 a 100mM. O máximo de atividade relativa alcançada foi de 2,5 sem a adição de NaCl, sendo que a adição de até 25mM provoca pouca ou nenhuma diminuição nesse perfil (**Figura 20a**). Uma queda da atividade de polimerase foi observada quando 50mM e 100mM de NaCl foram adicionados. Para preparação da reação, há adição de NaCl proveniente da solução de eluição da proteína e das condições de anelamento dos oligonucleotídeos. Assim sendo, todas as reações acima foram conduzidas com no mínimo 45mM desse sal e os dados acima se referem à necessidade de conduzir a reação com adição de NaCl.

A concentração de $MgCl_2$ foi variada de 0 a 100mM. Na ausência de $MgCl_2$, a reação não ocorreu uma vez que o Mg^{2+} esse sal atua como co-fator essencial da reação (**Figura 20b**). E as concentrações de 5mM e de 10mM renderam uma atividade relativa de cerca de 1,3. Concentrações maiores que 25mM são suficientes para abolir a reação de polimerização.

A atividade da DNA pol β foi testada também em diversos pHs (**Figura 21**). Em solução de pH 5 ou menor, a DNA pol β não apresentou atividade alguma. No pH 6, há uma pequena atividade de cerca de 0,5. A atividade máxima foi detectada em pH 7 que passou a ser o pH adotado em todas as reações. Houve uma queda de cerca de 40% nessa atividade em pH 8 e pH 9.

A atividade da DNA pol β também foi medida em diferentes temperaturas (**Figura 22**). A melhor polimerização ocorre na temperatura 37°C alcançando 5,0 pontos de atividade. Entretanto, a enzima também funciona nas temperaturas de 30 e 42°C, tendo atividades 60 e 80% mais baixas respectivamente.

A DNA pol β também é pouco sensível as concentrações de cada dNTPs sendo que uma variação de 10 a 300mM provocou pouca variação na atividade dessa enzima (**Figura 23**). As concentrações mais baixas de 10, 25 e 50 μ M geraram uma atividade de variaram em torno de 1,5. Ao passo que a concentração intermediária de 100 μ M gerou uma atividade também intermediária de 2,0. A melhor condição é com uma concentração mais alta de cada dNTP sendo que a atividade alcançou cerca de 2,5.

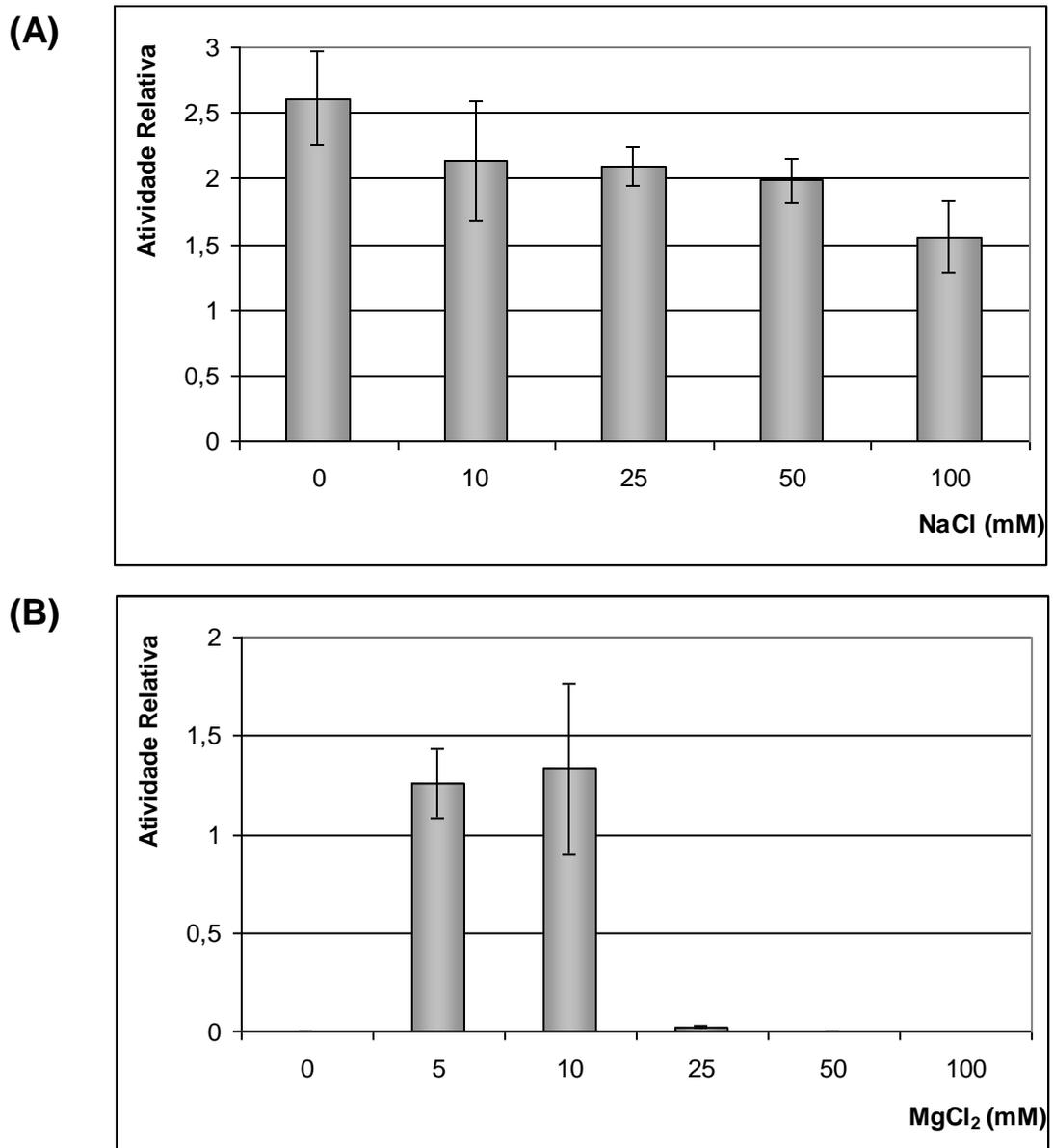


Figura 20. (A) Atividade relativa da TcDNA pol β em diferentes concentrações de NaCl. As reações foram conduzidas em Tris HCl pH 7,4 100mM, 10mM de MgCl₂, 100mM de cada dNTP durante duas horas a 37°C. Os dados se referem à adição de NaCl à reação final e não a sua concentração final. **(B)** Atividade relativa da TcDNA pol β em diferentes concentrações de MgCl₂. As reações foram conduzidas em Tris HCl pH 7,4 100mM, 100mM de cada dNTP durante duas horas a 37°C. Nos gráficos, estão representados a média e o desvio padrão de triplicatas.

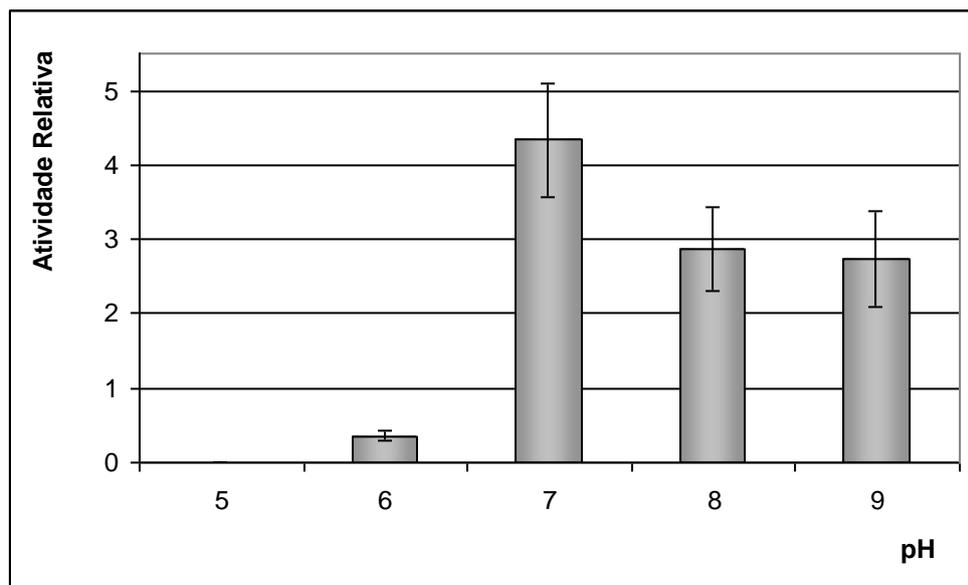


Figura 21. Atividade relativa da TcDNA pol β em diferentes pH. As reações foram conduzidas em Tris HCl 100mM com pH variando de 5 a 9, 10mM de $MgCl_2$, 100mM de cada dNTP durante duas horas a 37°C. Nos gráficos, estão representados a média e o desvio padrão de triplicatas.

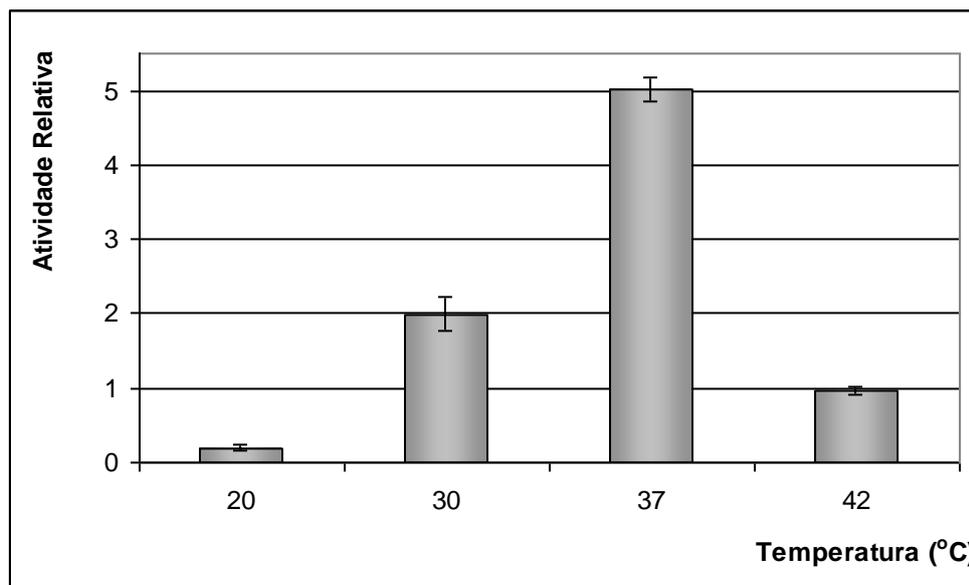


Figura 22. Atividade relativa da TcDNA pol β em diferentes temperaturas. As reações foram conduzidas em 100mM Tris HCl com pH 7,0, 200mM de dNTPs, 10mM de $MgCl_2$ durante duas horas. Nos gráficos, estão representados a média e o desvio padrão de triplicatas.

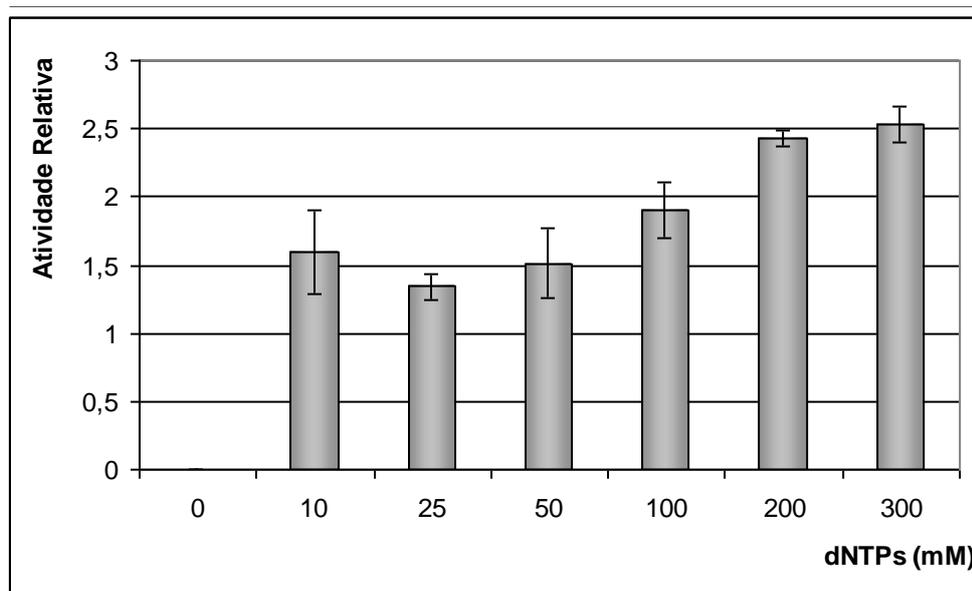


Figura 23. Atividade relativa da TcDNA pol β em diferentes concentrações de dNTPs. As reações foram conduzidas em Tris HCl pH 7,4 100mM, 10mM de $MgCl_2$ durante duas horas a 37°C. Nos gráficos, estão representados a média e o desvio padrão de triplicatas.

O tempo é outro fator que influencia na reação de polimerização. E por isso, a reação foi conduzida durante diferentes tempos para se verificar a capacidade dessa enzima em promover a extensão de seu substrato (**Figura 24**). Nos primeiros 15 minutos, a reação é bem baixa e apenas uma pequena detecção foi possível girando em torno de 0,3. Com 30 minutos de reação, há um incremento nessa reação sendo que ela parece dobrar alcançando aproximadamente 0,7. Um novo aumento ocorre após 45 minutos, havendo um novo dobramento da atividade relativa que gira em torno de 1,5. Os próximos minutos de reação, referentes ao tempo de 60 e 90 minutos alteram apenas um pouco esses valores. Entretanto, depois de 120 minutos, há detecção de um novo aumento e a atividade relativa chegando ao seu máximo de 2,3 pontos.

A natureza do nucleotídeo que serve como molde também influencia profundamente a eficiência da polimerização. Por isso, testamos se uma mudança na fita molde causaria uma mudança na polimerização. Na **Figura 25**, podemos observar que o oligonucleotídeo pA, assim como o pT, serve como um bom molde. Entretanto, os oligonucleotídeos pC e pCA não são eficientemente polimerizados e apenas picos intermediários são detectados (**Figura 25**). Curiosamente, quando foi utilizado um molde que continha um nucleotídeo modificado chamado 8-oxoguanina na segunda posição após o iniciador, a TcDNA pol β não foi capaz de completar a síntese como esperado, ela insere o nucleotídeo diante da lesão, mas é incapaz de continuar o processo de síntese (**Figura 26**).

4.12. Fidelidade da síntese da TcDNA pol β *in vitro*

As enzimas da família da DNA pol β não possuem capacidade revisora e, portanto, caso um nucleotídeo incorreto seja adicionado, outras proteínas são recrutadas para o sítio da lesão para corrigir tal erro. Utilizando o ensaio de síntese *in vitro* foi possível verificar que a TcDNA pol β pode cometer erros durante a síntese. Dois sistemas de oligonucleotídeos foram utilizados. No primeiro, o pT, que é um molde composto apenas por desoxitimas, foi

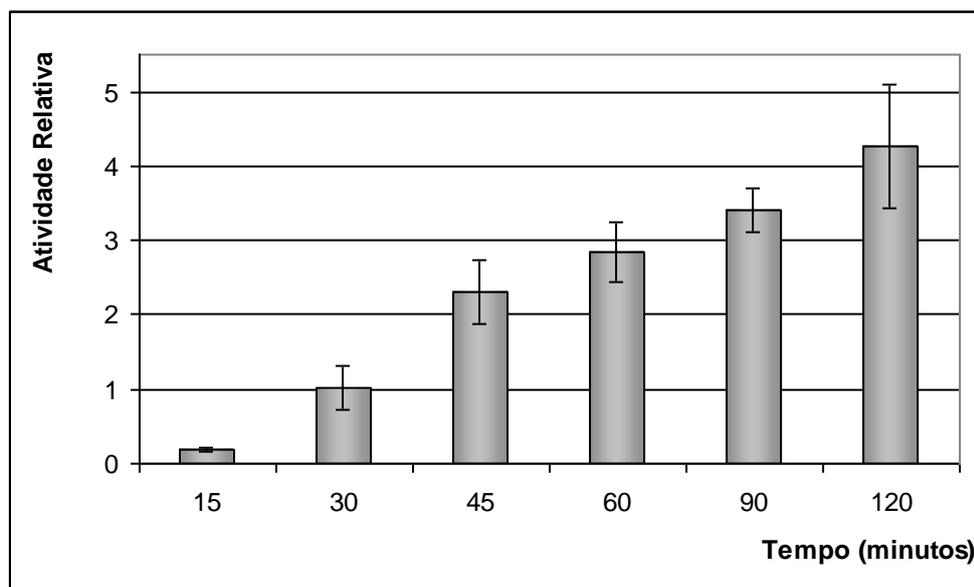


Figura 24. Atividade relativa da TcDNA pol β em diferentes tempos. As reações foram conduzidas em Tris HCl pH 7,0 100mM, 200mM de dNTPs, 10mM de $MgCl_2$ a 37°C. Nos gráficos, estão representados a média e o desvio padrão de triplicatas.

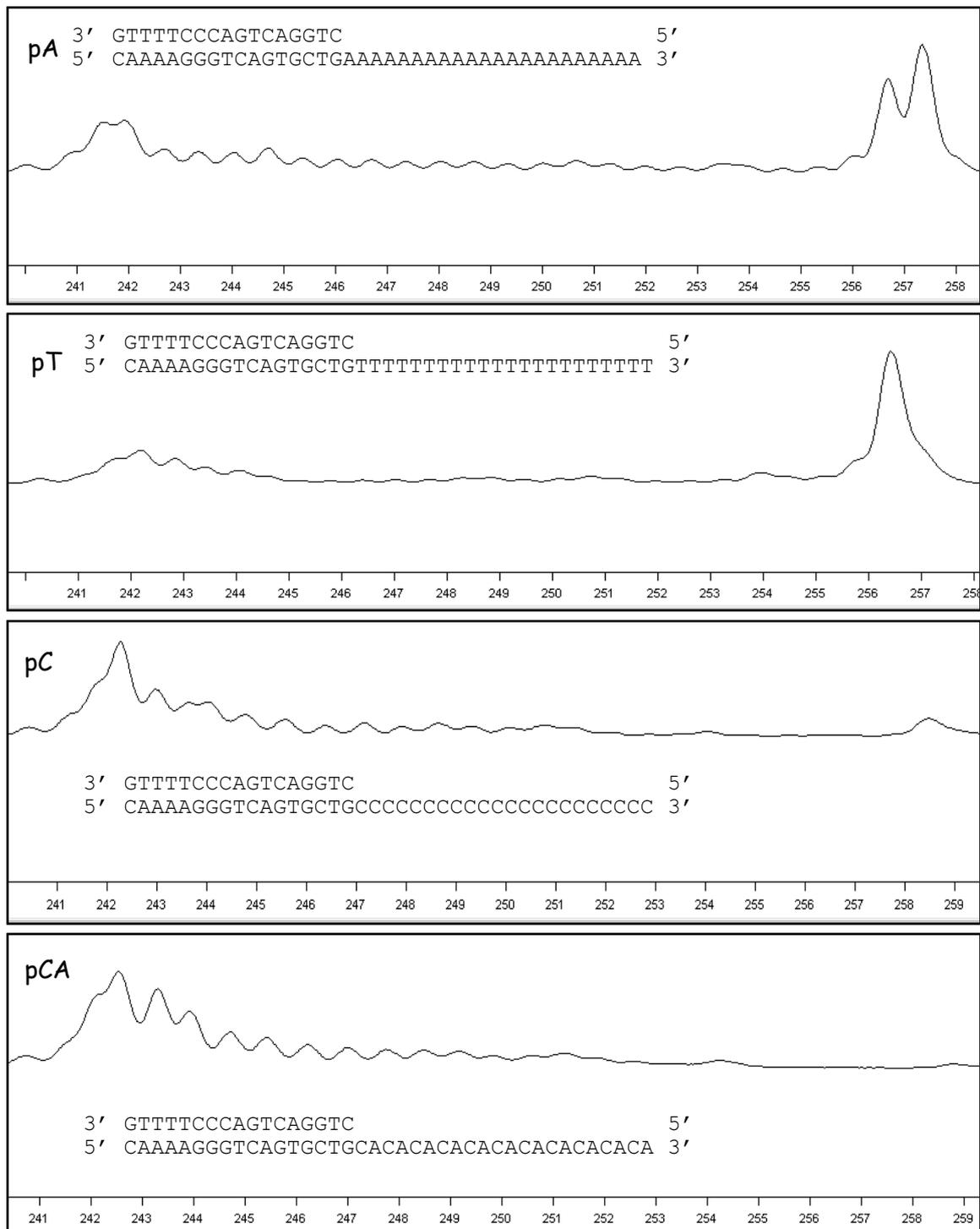


Figura 25. Síntese de DNA pela DNA pol β com diferentes oligonucleotídeos como molde. Essa proteína foi incubada em condições ótimas (Tris HCl pH 7,0 100mM, 200mM de dNTPs, 10mM de $MgCl_2$ durante duas horas a 37°C) com diferentes oligonucleotídeos (a seqüência de cada oligonucleotídeo está especificada no resultado correspondente).

sintM138HG 3' GTTTTCCCAGTCACGAC 5'
5' CAAAAGGGTCAGTGCTGG~~X~~ACTGGGTGTCTGAAGCTCTCTAGCATGA 3'

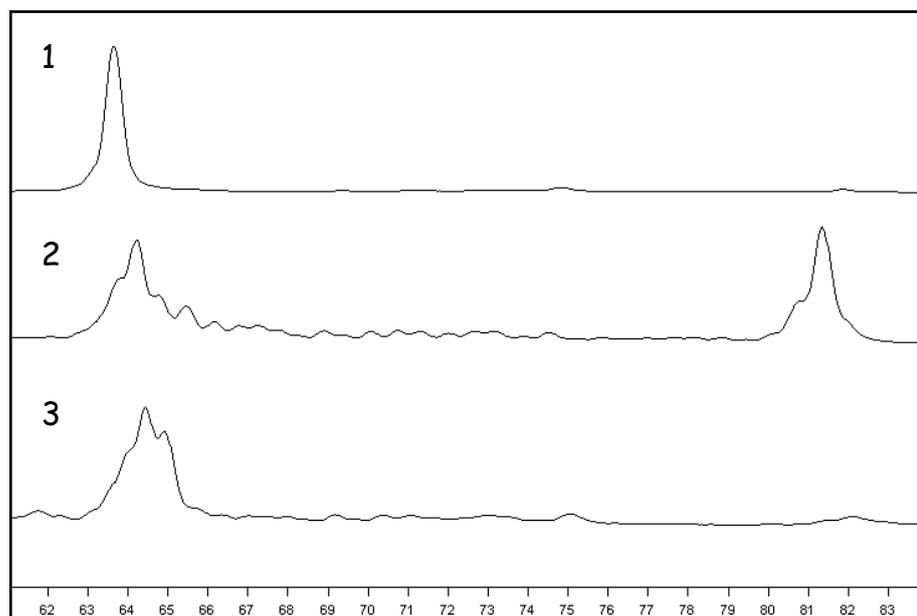


Figura 26. Síntese de DNA da DNA pol β com o oligonucleotídeo sintM138HG. A incubação foi feita em condições ótimas (Tris HCl pH 7,0 100mM, 200mM de dNTPs, 10mM de $MgCl_2$ durante duas horas a $37^\circ C$). Na canaleta 1, não foi adicionada proteína. Na canaleta 2, a reação de polimerização foi feita com a Klenow e na 3, com a DNA pol β . O X no molde sintM138HG representa a base modificada 8-oxoguanina.

incubado com cada um dos desoxirribonucleotídeos (**Figura 27**). A TcDNA pol β foi capaz de inserir dGTP sobre o molde pT, embora não tenha sido capaz de inserir dCTP e dTTP. No segundo (**Figura 28**), o molde pA2T, que é composto por desoxiadeninas mas possui uma interrupção com duas desoxitimas, foi incubado com a DNA pol β na presença de dTTP, sendo adicionado ou não dATP, dCTP ou dGTP. Novamente, essa enzima foi capaz de inserir dGTP sobre o molde de desoxitima, mas não foi capaz de adicionar dCTP.

4.13. Incorporação de didesoxinucleotídeos na molécula de DNA pela TcDNA pol β

Algumas DNA polimerases, como a DNA pol β humana, são capazes de inserir nucleotídeos como o AZT, os didesoxinucleotídeos e mesmo ribonucleotídeos ao DNA. Utilizando esse sistema de oligonucleotídeos, testamos também a capacidade da TcDNA pol β de inserir ddATP ao DNA. Tanto no sistema pT (**Figura 29**) como no pA2T (**Figura 30**), o ddATP foi incorporado ao DNA. Entretanto, esse nucleotídeo tem uma baixa capacidade de competir com o dATP (**Figura 30**), uma vez que esse nucleotídeo adicionado na concentração de $5\mu\text{M}$ já é capaz de competir com ddATP cuja concentração era 40 vezes maior.

pT 3' GTTTTCCCAGTCACGAC 5'
 5' CAAAAGGGTCAGTGCTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'

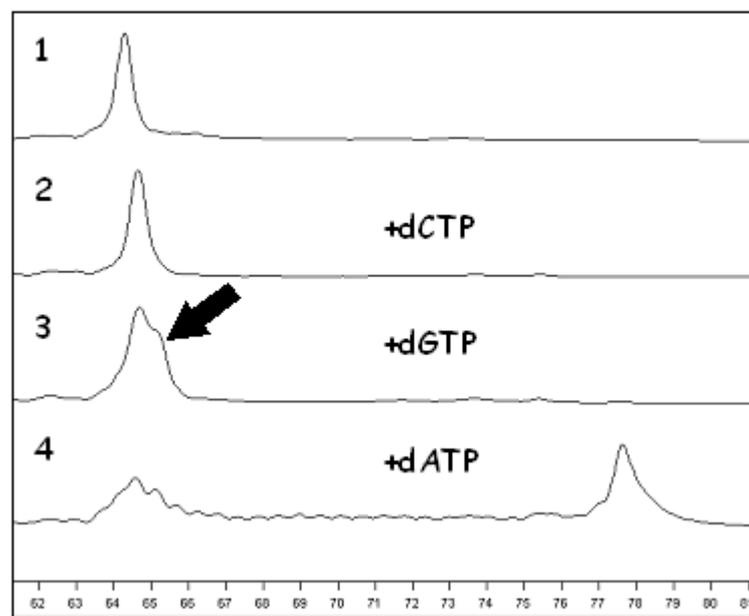


Figura 27. Fluorograma das reações de síntese da DNA pol β com o oligonucleotídeo pT. Essa proteína foi incubada em condições ótimas (Tris HCl pH 7,0 100mM, 200mM de dNTPs, 10mM de $MgCl_2$ durante duas horas a $37^\circ C$) sendo que na canaleta 1, não foram adicionados nucleotídeos; na canaleta 2, foi adicionado dCTP; já na canaleta 3, dGTP e na canaleta 4, dATP. A seta indica a detecção do novo pico.

pA2T 3' GTTTTCCAGTCACGAC 5'
 5' CAAAAGGGTCAGTGCTGAAAAATTAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'

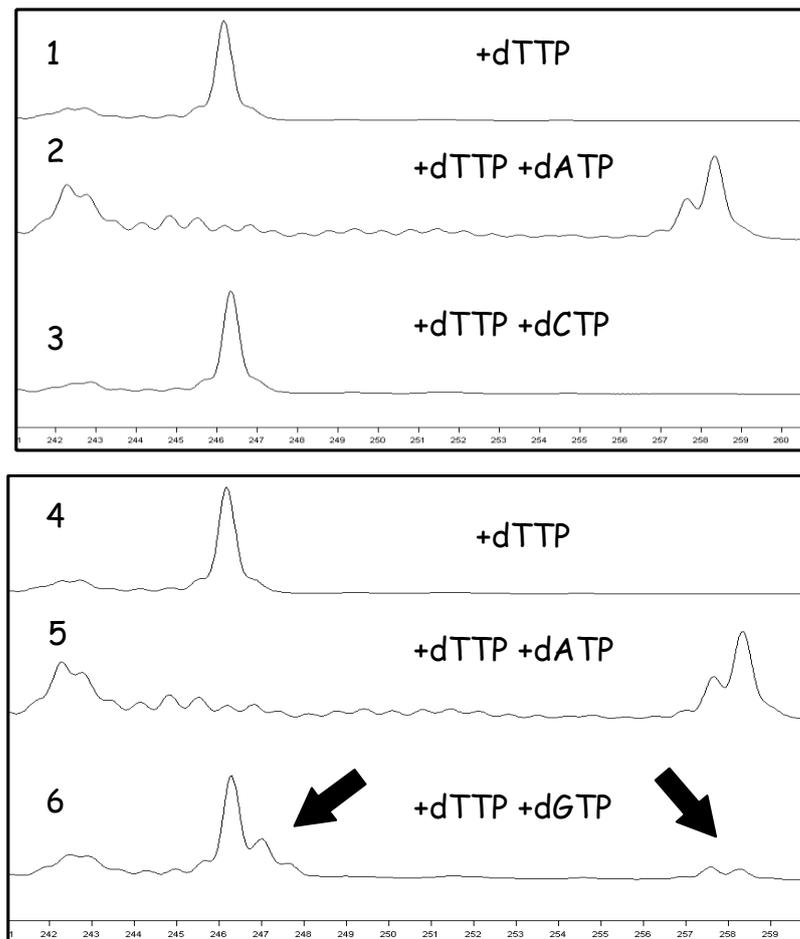


Figura 28. Fluorograma das reações de síntese da DNA pol β com o oligonucleotídeo pA2T como molde. Em todas as canaletas, foi adicionado dTTP. As reações foram feitas em condições ótimas. Nas canaletas 1 e 4, não foram adicionados outros nucleotídeos. Nas canaletas 2 e 5, foi adicionado dATP, já na canaleta 3, dCTP e na canaleta 6, dGTP. As setas indicam a detecção de picos.

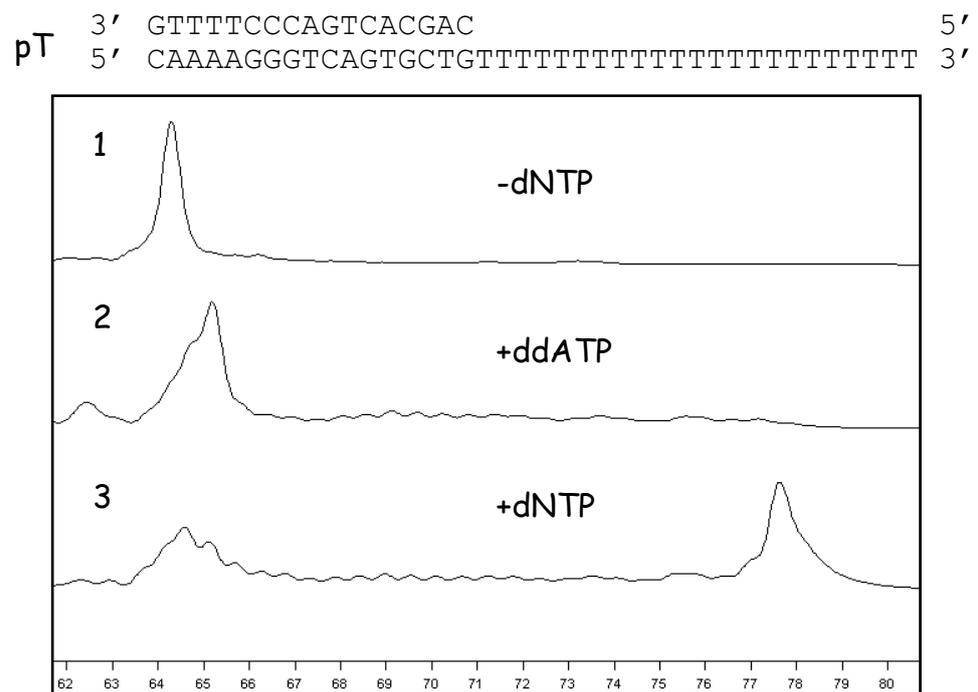


Figura 29. Fluorograma das reações de síntese da DNA pol β com o oligonucleotídeo pT como molde. Na canaleta 1, não foram adicionados nucleotídeos. Nas canaletas 2, foi adicionado ddATP, já na canaleta 3, foram adicionados todos dNTPs.

pA2T 3' GTTTTCCCAGTCACGAC 5'
 5' CAAAAGGGTCAGTGCTGAAAAATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'

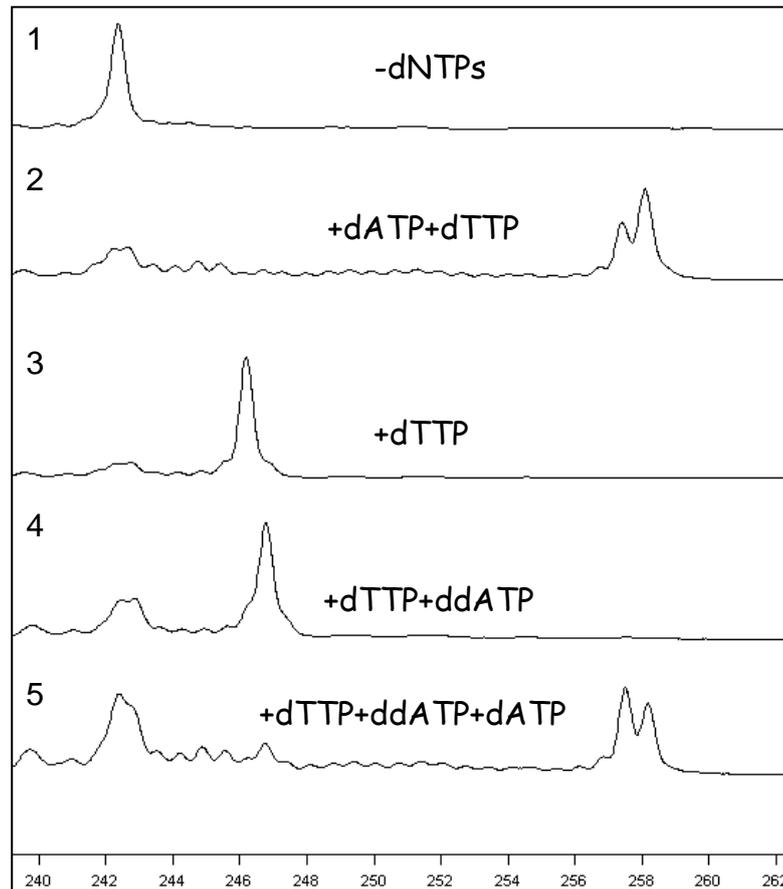


Figura 30. Fluorograma das reações de síntese da TcDNA pol β com o oligonucleotídeo pA2T como molde. Na canaleta 1, não foram adicionados nucleotídeos. Na canaleta 2, foi adicionado dATP e dTTP, na 3, apenas dTTP, na 4, dTTP e ddATP e na 5, dTTP, ddATP e dATP. Todos os nucleotídeos foram adicionados na concentração de 200 μ M exceto o dATP na canaleta 5 que foi na concentração de 5 μ M.

5. Discussão

O *Trypanosoma cruzi*, desde a sua descoberta em 1909 por Carlos Chagas, tem se mostrado um organismo ímpar. Sua biologia revela uma grande complexidade e suas características instigam a curiosidade daqueles que tem acesso às informações ainda escassas a cerca desse parasito. Muitos marcadores moleculares já foram utilizados para caracterizar isolados obtidos a partir de barbeiros, de animais silvestres e do homem. Um aspecto especialmente interessante é a diversidade e a complexidade dos isolados. Em 1999, em um simpósio comemorativo do aniversário de 90 anos da descoberta da doença de Chagas, essas informações foram usadas para se definir dois grupos principais desse parasito: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Entretanto, várias cepas não puderam ser classificadas por possuírem marcadores que não as incluíam em nenhum desses grupos. Recentemente, foi sugerido um novo grupo, *T. cruzi* III, que permite a reunião de algumas dessas cepas baseada no fato delas possuírem os mesmos marcadores de DNA mitocondrial (Freitas *et al.*, 2006). As cepas híbridas não seriam incluídas em nenhum grupo e seriam provenientes de raros eventos de troca genéticas entre cepas do grupo *T. cruzi* II e *T. cruzi* III. Um desafio no estudo do *T. cruzi* é entender quais mecanismos ligados ao metabolismo do DNA governam a geração de variabilidade desse parasito. São também esses mesmos mecanismos que definem o grau de plasticidade genética desse organismo. Eles podem estar diretamente relacionados à sua sobrevivência em ambientes diversos, alguns deles hostis como aqueles criados por processos imunológicos de seus hospedeiros e pelo uso de fármacos contra o mesmo. Um terceiro ponto de interesse relacionado ao metabolismo de DNA é que algumas de suas vias são essenciais para um bom funcionamento da célula. O conhecimento de como elas se estruturam e quais proteínas delas participam pode definir alvos para desenvolvimento de fármacos para o tratamento da doença causada pelo *T. cruzi*. Para se obter informações a cerca do metabolismo de DNA é, portanto, necessário conhecer e caracterizar os genes envolvidos nesse processo bem como seus produtos. A publicação do genoma do *T. cruzi* representa um grande avanço em direção a isso uma vez que muitos genes e vias de reparo em *T. cruzi* puderam ser identificados. Entretanto, apenas um pequeno número desses genes foi caracterizado, e este trabalho visa contribuir para a caracterização de dois

genes do metabolismo de DNA em *T. cruzi*: o da DNA polimerase β (TcDNA pol β) e o *TcRad51*.

O gene *TcRad51* foi inicialmente descrito em dissertação de mestrado (Regis-da-Silva, 2002). Naquele trabalho, realizamos a clonagem desse gene, determinamos a sua seqüência e investigamos algumas de suas características. Primeiro, através da comparação com a seqüência de proteínas de outros organismos, foi possível identificar, na proteína de *T. cruzi*, uma série de domínios característicos e necessários para a função de recombinase exercida por Rad51. Além disso, detectamos mRNA desse gene em todas as formas desse parasito, sugerindo que o processo de recombinação está eventualmente presente em todos eles, mesmo na forma não replicativa. Entretanto, os níveis de mRNA são maiores nos estágios replicativos, especialmente na forma amastigota, provavelmente porque nos estágios replicativos o metabolismo do DNA é mais intenso. É possível que um nível maior de mRNA na forma amastigota tenha ainda uma relação com o fato dessa forma ser um estágio intracelular e estar exposta a produtos do metabolismo do seu hospedeiro que podem causar lesões no DNA e, portanto, estimular o processo de recombinação. Todavia, não possuíamos nenhuma evidência do envolvimento desse gene nesse processo. Aqui, mostramos que Rad51 pode realmente ter uma função nessa via. Utilizamos, para isso, células CHO K1 DRA10 que possuem duas seqüências inativas do gene *Neo* que confere resistência ao antibiótico neomicina bem como ao seu análogo G418 (Liang *et al.*, 1998). Na primeira cópia, foi inserida uma seqüência chamada I-Scel que retira o gene de fase. A segunda seqüência não possui a região 5' sendo, portanto, uma seqüência não expressa. Dessa forma, células resistentes a G418 só surgem pelo processo de recombinação entre as duas cópias inativas. Transfectamos essas células com plasmídeo contendo o gene *TcRad51* e a expressão do mesmo levou a um aumento do número de clones resistentes a G418. Esse fenômeno pode ter relação com um estímulo do produto do gene *TcRad51* ao processo de recombinação, uma vez que esse gene possui 46% de similaridade com o gene de hamster.

O processo de recombinação é uma via bastante acurada que permite o reparo das quebras de dupla fita (Kaanar *et al.*, 1998). Essa lesão pode ser

gerada pela radiação γ . Em células de mamíferos, já existe uma relação definida entre a expressão de *Rad51*, a recombinação e o reparo dessas lesões (van Velen *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2003; Vispe *et al.*, 1998). A exposição de epimastigotas de *T. cruzi* à radiação γ mostra que essas células apresentam resistência as lesões causadas por esse agente. A LD₅₀ é de 1000Gy que uma dose 50 a 100 vezes maior que LD₅₀ das células de raízes de plantas (Jiang *et al.*, 1997), do *Plasmodium falciparum* (Geoghegan *et al.*, 2001) ou de células de mamíferos (Yonetani *et al.*, 2005; Takata *et al.*, 2005). Portanto, é possível que o processo de recombinação seja uma via altamente ativa no metabolismo do DNA desse parasito. Uma vez que Rad51 é uma proteína central no processo de recombinação, foi interessante notar que há um aumento de até quatro vezes no mRNA relativo a essa proteína nas células irradiadas quando comparadas as não irradiadas 4 horas após a exposição. Esse dado corrobora a participação da proteína no processo de recombinação e reparo de quebra de fita dupla. A presença das quebras da dupla fita de DNA e o seu reparo foram evidenciados na análise dos géis de agarose resolvidos pela PFGE. Pode se notar a quebra dos cromossomos por causa da presença de um rastro de DNA logo após a irradiação. E a reconstituição dos cromossomos 48 após a exposição indica que as quebras foram reparadas. Interessantemente, a curva de crescimento das células irradiadas indica não haver queda no número de parasitos. Há, por outro lado, uma extensão da fase “lag” para cerca de 8 a 10 dias. Dada a presença de lesões no DNA como mostrado pela PFGE, isso só pode ser explicado se, mais uma vez, considerarmos que uma grande fração dos parasitos conseguiu reparar seu material genético e restabelecer suas funções celulares. Em eucariotos, uma segunda via conhecida como “non-homologous end joining” pode reparar também as quebras de dupla fita. Entretanto, ela é susceptível a erros, pois, como implícito no próprio nome, ela não é dirigida pela homologia. Em *T. cruzi*, alguns genes dessa via não foram encontrados (El-Sayed *et al.*, 2005), indicando, que assim como em *P. falciparum* (Gardner *et al.*, 2002), essa via poderia estar ausente. Essa informação reforça a importância da recombinação no metabolismo do DNA uma vez que ela é provavelmente a única via para o reparo das quebras de dupla fita. Interessantemente, assim como o *T. brucei*, dados do projeto genoma indicam a presença de vários parálogos de Rad51

(RAD51-3, RAD51-4, RAD51-5, RAD51-6, DMC1) em *T. cruzi*. Os produtos de homólogos desses genes em eucariotos superiores são responsáveis pela regulação do processo de recombinação. Em *T. brucei*, os genes Rad51-3 e Rad51-5 foram caracterizados e estão também relacionados à regulação do processo de recombinação e Rad51-3, em especial, está relacionado à variação antigênica (Proudfoot e McCulloch, 2005). Logo, é possível que assim como em *T. brucei*, em *T. cruzi*, esses genes tenham uma função regulatória necessária para o bom andamento da recombinação. Um outro dado interessante é que, em células de mamíferos, a expressão aumentada de Rad52 inibe a recombinação homóloga dependente de Rad51 ao mesmo tempo em que favorece outras vias que não dependem dessa proteína (Yanez e Porter, 2002). Curiosamente, nenhum gene homólogo a Rad52 foi encontrado em *T. cruzi*. Logo, juntamente com o fato de possivelmente não haver outras vias de reparo de quebra de fita dupla, a ausência de Rad52 reforça a importância do processo de recombinação dirigido por Rad51.

A caracterização inicial do gene *Rad51* nos permite formular várias novas perguntas em relação à biologia desse parasito. Uma questão é que embora tenhamos usado a radiação γ como modelo de estudos, o *T. cruzi* não está submetido a esse tipo de estresse, logo qual a real importância do processo de recombinação para o *T. cruzi*? Há várias sugestões para essa pergunta e nenhuma delas exclui a possibilidade da outra também ser verdadeira. Uma das respostas é que outros tipos de lesões podem gerar quebras de dupla-fita. Um exemplo de como isso é possível foi descrito na bactéria *Deinococcus radiodurans*, que apresenta uma resistência muito mais alta a radiação γ que o *T. cruzi*. Isso se deve ao fato dessa bactéria ser bastante resistente ao ressecamento que acaba causando um grande número de quebras de dupla fita (Mattimore e Battista, 1996; Battista *et al.*, 1999). Dessa forma, uma possibilidade é que os produtos de metabolismo das células ou mesmo substâncias produzidas pelo sistema imunológico, como o óxido nítrico, gerariam quebras da dupla fita. E o processo de recombinação poderia de ser suma importância para manter a viabilidade de parasitos submetidos a esse tipo de estresse. Já é sabido que o óxido nítrico é um potente efector da resposta imunológica contra esse parasito (Silva *et al.*, 2003; Saeftel *et al.*,

2001) e ainda que ele causa, entre outras coisas, quebras em cromossomos (Wu *et al.*, 2006).

Um outro ponto interessante relacionado à biologia desse parasito que pode ser relacionado ao processo de recombinação é a homogeneidade das famílias gênicas. Em *T. cruzi*, há uma grande expansão de alguns genes compondo grupos com inúmeros membros. Alguns são pseudogenes, outros têm potencial para serem ativos. Por exemplo, as MASPs (do inglês, Mucin-associated surface proteins), que são proteínas encontradas apenas no *T. cruzi*, podem ser codificadas por 944 genes e existem ainda cerca de 433 pseudogenes relacionados a elas (El-Sayed *et al.*, 2005). Essas famílias gênicas podem apresentar dois tipos de organização: agrupamentos em tandem ou espalhadas pelo genoma (El-Sayed *et al.*, 2005). A recombinação deve ter tido um papel essencial na expansão dessas famílias e deve ser uma das vias que podem ser associadas a manter certo grau de homologia entre elas. A caracterização inicial do gene *TcRad51* representa apenas o início de um trabalho que pode permitir uma melhor compreensão da biologia molecular do *T. cruzi*. Um passo já dado por nosso grupo foi a construção de uma linhagem que possui uma expressão aumentada desse gene. A partir daí, inúmeras são as possibilidades para se definir melhor a importância do processo de recombinação para esse parasito.

O segundo gene escolhido, da DNA pol β , tem sido extensivamente estudado em outros organismos devido a sua relação com o câncer. Várias de suas peculiaridades já foram definidas.

Aproximadamente 37 seqüências associadas a DNA polimerases foram identificadas através de homologia no genoma de *T. cruzi*. Esse parasito apresenta nove das 14 DNA polimerases conhecidas em eucariotos (**Tabela IV**): DNA pol β , κ (kappa), δ (delta), ϵ (epsilon), η (eta), ζ (zeta), σ (sigma), θ (theta), Rev1 e primase. Ele possui representantes de todas as famílias de polimerases envolvidas em vários processos: replicação, síntese de iniciadores, reparo de DNA, síntese translesão, replicação e reparo do DNA mitocondrial e, por fim, geração de mutações somáticas. É interessante que *T. cruzi* possui seqüências homólogas às subunidades que formam a DNA polimerase I, uma enzima bacteriana envolvida no reparo de DNA em

Tabela IV. DNA polimerase e suas famílias.

<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>H. sapiens</i>	Família	Função ^a
Pol I	-	Pol I	-	A	Replicação e Reparo de DNA (Em <i>T. cruzi</i> , pode estar envolvida na replicação do kDNA).
Pol II	-	-	-	B	Reparo de DNA
Pol III	-	? ^b	-	C	Replicação
Pol V	-	-	-	Y	Síntese Translesão
Pol IV	-	Pol κ	Pol κ	Y	Síntese Translesão
-	-	Pol β	Pol β	X	Reparo por excisão de base.
-	Pol α	Primase	Pol α	B	Síntese de iniciadores.
-	Pol δ	Pol δ	Pol δ	B	Replicação de DNA.
-	Pol ϵ	Pol ϵ	Pol ϵ	B	Replicação de DNA.
-	Pol γ	-	Pol γ	A	Replicação do DNA mitocondrial.
-	Pol IV	-	Pol λ	X	Reparo por excisão de base.
-	Rev1	Rev1	Rev1	Y	Síntese translesão.
-	Pol η	Pol η	Pol η	Y	Síntese translesão e recombinação.
-	Pol ζ	Pol ζ	Pol ζ	A	Síntese translesão.
-	-	-	Pol ι	Y	Síntese translesão.
-	-	-	Pol μ	X	Mutações espontâneas nos genes de imunoglobulinas.
-	-	Pol θ	Pol θ	A	Mutações espontâneas nos genes de imunoglobulinas e síntese translesão.
-	-	-	Pol ν	A	?
-	-	Pol σ	Pol σ	?	Replicação de DNA (manutenção da coesão das cromátides irmãs)
-	-	Pol β -PAK	-	X	Replicação do DNA mitocondrial.

^aRevisado por Friedberg (2006), Hübscher e colaboradores (2002) e O'Donnell (2006).

^bApenas a subunidade ϵ da DNA polimerase III.

procariotos. Em *T. cruzi*, os produtos desses genes possuem sinal de direcionamento para mitocôndria. Juntamente com a ausência de DNA pol γ nesse organismo, isso pode sugerir que esses genes codificam proteínas envolvidas no processo de replicação do kDNA. Entre essas 37 seqüências está também um único alelo de um gene que codifica uma proteína com homologia a cadeia ϵ da DNA polimerase III que também é uma proteína da família das DNA polimerases C encontrada em procariotos (Revisado por Friedberg, 2006).

Uma outra curiosidade a respeito das polimerases nesse parasito é que ele possui uma polimerase que foi encontrada apenas em organismos de sua ordem. Essa enzima chamada DNA pol β -PAK é paróloga a DNA pol β . Três das seqüências encontradas no genoma de *T. cruzi* estão associadas a essa proteína. Em *T. brucei*, essa enzima possui uma região de 300 resíduos na porção N-terminal. Tal região é rica em prolinas, alaninas e lisinas e tem homologia com a seqüência da proteína 1 associada ao cinetoplasto e com a primase, proteínas de *C. fasciculata* (Saxowsky *et al.*, 2003). Curiosamente, embora as enzimas de *T. cruzi* e de *L. major* tenham recebido esse nome também, elas não possuem essa região em sua seqüência. Assim como as outras DNA pol β , as enzimas parálogas possuem um possível sinal de localização mitocondrial. Em *T. brucei*, tal localização já foi confirmada (Saxowsky *et al.*, 2003).

A seqüência protéica da DNA pol β é bastante conservada entre os tripanossomatídeos. Isso poderia sugerir que há também uma conservação também na função da mesma no metabolismo de DNA. Todavia, a proteína de *L. infantum* foi localizada no núcleo e possui atividades enzimáticas condizentes com sua participação no reparo de DNA (Taladriz *et al.*, 2001; Alonso *et al.*, 2006). Por outro lado, a proteína de *T. brucei* foi localizada na mitocôndria e pode estar envolvida no processo de replicação do DNA dessa organela, o kDNA, com uma função diferente da TcDNA pol β -PAK (Saxowsky *et al.*, 2003). O que define a localização de uma proteína para a mitocôndria é a presença de uma grande quantidade de resíduos de aminoácidos positivos e a capacidade de se formar uma estrutura secundária de hélice α (Revisado por Rehling, 2001). Pode se observar que há uma grande quantidade de

aminoácidos com carga positiva na região N-terminal das DNA pol β de tripanossomatídeos e a maior parte dos programas de predição de localização protéica as apontam como mitocondriais. Entretanto, esses parâmetros não podem ser tidos como completamente válidos uma que vez que esses organismos podem apresentar diferenças, ou pequenas particularidades, em seu sistema de endereçamento que ainda não é bem conhecido.

As DNA polimerases β dos tripanossomatídeos possuem uma grande conservação na região N-terminal. É nessa região que se encontra um domínio de 8kDa que é responsável pela atividade de dRP liase. Esse domínio remove o esqueleto de desoxiribose fosfato que perdeu base em consequência da ação de DNA glicosilases ou mesmo espontaneamente. Essa atividade é mais associada ao reparo por excisão de base e já foi descrita na DNA pol β de *L. infantum* (Alonso *et al.*, 2006). Devido ao alto grau de conservação dessa região, é possível que todas as DNA polimerases β de tripanossomatídeos conservem essa atividade.

A TcDNA pol β possui também 27 resíduos de aminoácidos conservados na família das DNA polimerases X. Esse resíduos se distribuem por toda a seqüência e fazem parte de vários domínios e alguns deles estão associados à ligação ao DNA, aos dNTPs e também aos íons metálicos que agem como cofatores na atividade de polimerização. Uma vez que há uma grande conservação nos mecanismo de polimerização (Steitz, 1998), a presença desses aminoácidos pode ser uma indicação que essa enzima promove a reação de síntese de DNA de uma maneira muito similar às outras DNA polimerases. A TcDNA pol β possui um resíduo de fenilalanina na posição 368 que é uma tirosina em outros organismos. Na T7 DNA polimerase, a substituição de uma tirosina na posição 526 por uma fenilalanina gera um aumento no grau de discriminação entre o didesoxirribonucleotídeo e o desoxirribonucleotídeo (Tabor e Richardson, 1995). Curiosamente, a TcDNA pol β possui uma alta capacidade de distinção entre esses dois substratos, e mesmo quando os didesoxinucleotídeos estão numa concentração 40 vezes maior ela parece ter preferência pelos desoxirribonucleotídeos. Entretanto, não é possível estabelecer uma relação na seqüência entre o resíduo na posição 526 da T7 DNA polimerase e a posição 368 da TcDNA pol β , uma vez que

essas enzimas não tem homologia entre si. Se houver alguma relação, ela pode ser estrutural. Assim, seria interessante verificar através de mutagênese sítio dirigida se há mudança da fenilalanina para tirosina teria implicações sobre a maneira como a TcDNA pol β reconhece e diferencia entre desoxirribonucleotídeos e didesoxirribonucleotídeos. É interessante ressaltar que essa característica não é compartilhada pela DNA pol β humana que não consegue diferenciar bem entre eles sendo que há a mesma chance dela inserir um ou outro quando os mesmo estão na mesma concentração (Louat *et al.*, 2001).

A atividade de polimerização da TcDNA pol β foi testada *in vivo* e *in vitro*. Células bacterianas da linhagem SC18-12 foram transformada com os vetores pMAL e o mesmo vetor contendo o gene da TcDNA pol β . Essas células possuem uma mutação no gene *PolA* que codifica para a DNA polimerase I. Essa enzima participa da replicação do DNA bacteriano preenchendo os pequenos espaços deixados entre os fragmentos de Okazaki ou mesmo espaços deixados pelo sistema de reparo. A mutação *polA12^{ts}* na cepa SC18-12 promove a perda de função do seu produto quando colocado para crescer a 42°C. Por outro lado, essa cepa tem crescimento normal a 30°C. Assim, quando a cepa transformada carregando um plasmídeo pMAL foi colocada para crescer a temperatura de 42°C, não houve crescimento. Ao contrário, uma cepa carregando um plasmídeo contendo o gene da TcDNA pol β foi capaz de crescer indicando que o gene *TcDNA pol β* foi capaz de complementar a deficiência dessa bactéria. A DNA pol β em outros organismos foi descrita como um proteína envolvida no reparo de DNA cuja função era justamente preencher pequenos espaços deixados pelo sistema de reparo (Beard WA e Wilson SH., 2006; Krishna *et al.*, 2005), logo há uma sobreposição de funções bioquímicas entre a DNA pol β e a DNA pol I bacteriana. Assim, esses resultados sugerem que a TcDNA pol β também conserva essa característica e que em, *T. cruzi*, ela também deve ser responsável pelo preenchimento de espaços no DNA, embora não possamos afirmar como surgem esses espaços, se como produto do processo de reparo ou de replicação. Ainda com relação à capacidade de síntese da TcDNA pol β , a enzima purificada em fusão com a MBP foi colocada na presença de um oligonucleotídeo anelado a um iniciador e

os quatro dNTPs e, em condições adequadas, essa enzima foi capaz de fazer a extensão do iniciador. Mais uma vez, a TcDNA pol β comportou-se como suas enzimas homólogas, sendo capaz de fazer a síntese de maneira distributiva, ou seja, ela insere apenas poucos nucleotídeos ao iniciador cada vez que se liga ao substrato. Essa característica é comum a proteínas que fazem preenchimento de espaços no DNA e que não fazem a replicação de longas fitas de DNA.

Um outro aspecto ligado à síntese de DNA pela DNA pol β em outros organismos é a falta de uma grande exigência relacionada ao seu substrato. Dessa forma, enquanto enzimas como a DNA pol δ são altamente fidedignas ao processo de replicação exigindo um molde ileso, a DNA pol β tem sido relacionada a processos de síntese translesão, sendo capaz de sintetizar DNA quando o substrato contém lesões como às causadas pela luz U.V. e pela cisplatina (Canitrot *et al.*, 1998; Servant *et al.*, 2002). As células SC18-12 apresentam uma mutação no gene *uvrA* e, portanto, não são capazes de reparar eficientemente lesões causadas pela luz U.V. Dessa forma, essas células são sensíveis a esse agente. Quando células carregando o plasmídeo vazio foram irradiadas, esse fenótipo pode ser confirmado. E células carregando plasmídeo com o gene *TcDNA pol β* conseguem resistir a exposição a luz U.V. Como a enzima não possui nenhuma homologia com a proteína UvrA, ela não conseguiria substituí-la em sua função, o que sugere que a TcDNA pol β realiza síntese translesão. O *T. cruzi* é um parasito obrigatório e não possui nenhum estágio de vida livre. Sua exposição à luz U.V. seria um evento completamente raro. Como explicar então a habilidade que a TcDNA pol β tem para fazer a extensão da molécula de DNA quando diante dessa lesão? Uma possível resposta é que essa característica pode ser intrínseca a estrutura dessa proteína e que a perda dessa capacidade poderia representar também a perda de sua função. Também não pode ser descartada a possibilidade da TcDNA pol β participar do reparo de lesões causadas por outros agentes, que assim como a luz U.V., promovam modificações da estrutura da molécula de DNA.

Um tipo de lesão muito comum presente como produto do metabolismo interno são as modificações na base guanina causadas por agentes oxidantes.

Essas lesões, conhecidas como 8-oxoguanina, são extremamente mutagênicas porque permitem que a guanina seja pareada a uma adenina causando assim na próxima rodada da replicação uma transversão de guanina para timina. A maior parte das polimerases não é capaz de diferenciar essa lesão e podem sintetizar diante das mesmas cometendo erros ou não. A DNA pol β humana foi descrita quanto a sua habilidade de sintetizar diante dessa lesão e, embora ela seja capaz de fazer a extensão da molécula de DNA, ela o faz com erro, aumentando grandemente a taxa de mutação. Foi surpreendente notar que a DNA pol β não é capaz de fazer eficientemente a síntese diante dessa base. Isso torna essa enzima um modelo singular uma vez que comparações entre a estrutura tridimensional dessa enzima e da sua homóloga em humanos podem fornecer informações sobre o mecanismo de síntese de DNA.

O AZT é um nucleotídeo modificado onde o OH 3' é substituído por um grupo azido ($-N_3$). Uma vez inserido no DNA, esse nucleotídeo impede a inserção de outros nucleotídeos causando a parada do processo de síntese e, no caso de incorporação no DNA celular, ele pode causar a morte das células durante o processo de replicação. Nakajima-Shimada e Aoki (1998) mostraram que células amastigotas em cultura apresentam uma diminuição na sua eficiência de infecção e também uma diminuição no número de parasitos nas células infectadas na presença de AZT. Foi possível detectar uma sensibilidade a esse nucleotídeo também em epimastigotas das cepas CL Brener, JG e Colombiana. Foi possível também notar uma maior sensibilidade da cepa JG se comparada às outras duas. Essas cepas possuem marcadores genéticos e alguns marcadores fenotípicos diferentes sendo que JG pertence ao grupo *T. cruzi* II, Colombiana, ao grupo *T. cruzi* I e CL Brener é híbrida (Freitas *et al.*, 2006). Essas diferenças se refletem também em seu comportamento biológico. Dessa forma, são conhecidas cepas com características diferenciadas em relação à resistência a drogas (Urbina *et al.*, 2003, Veloso *et al.*, 2001), tropismo tecidual (Andrade *et al.*, 1999) e vários outros parâmetros. Assim, a diferença na toxicidade do AZT entre as cepas pode ser devido a diferenças biológicas relacionadas à entrada da droga no parasito, a transformação da droga por fosforilação ou na incorporação da mesma no DNA. Dois grupos de enzimas são conhecidos por sua habilidade em incorporar o AZT ao DNA. Um desses grupos é composto por enzimas com atividade de transcriptase reversa

que, em células eucarióticas, são representadas principalmente pelas telomerasas. Todavia, não são enzimas com atividade de transcriptase reversa as responsáveis pela incorporação de AZT em *T. cruzi* (Nakajima-Shimada e Aoki, 1998). O outro grupo de enzimas é o das DNA pol β . Aqui mostramos que a TcDNA pol β durante o processo de síntese é capaz de reconhecer e inserir esse nucleotídeo em seu substrato *in vitro*. A concentração necessária para inibir o processo de síntese é de 100 μ M. Da mesma forma, apenas concentrações maiores que 100 μ M são capazes de causar a morte do *T. cruzi*. Assim, parece haver uma correlação entre a concentração dessa molécula necessária para inibir a síntese de DNA e a concentração necessária para causar a morte da forma epimastigota de *T. cruzi*. Esses dados podem sugerir que a TcDNA pol β seria a principal enzima envolvida na utilização do AZT como substrato do processo de síntese de DNA. Dessa forma, a maior toxicidade do AZT na cepa JG pode ter relação com um aumento na expressão dessa enzima ou mesmo com diferenças bioquímicas entre as enzimas das outras cepas e a JG.

A atividade da TcDNA pol β foi testada em diferentes condições para verificar qual a condição ótima de síntese. Em relação à concentração de NaCl, essa enzima funciona melhor na concentração de 45mM. Tanto no anelamento quanto na purificação dessa proteína, esse sal é utilizado e, portanto, este sal já está presente na concentração ótima e não precisa ser adicionado na reação de polimerização. De fato, a adição do mesmo provoca diminuições discretas na atividade dessa enzima dependendo da concentração final resultante. A Klenow também funciona muito bem a 50mM de NaCl. A Taq pol funciona bem em 50mM de KCl. A enzima de DNA pol β de *T. brucei* foi testada também quanto à concentração de sal, entretanto o sal utilizado foi o KCl. A concentração ideal desse sal para essa enzima também foi por volta de 50mM (Saxowsky *et al.*, 2003). Concentrações maiores de sal parecem diminuir a atividade máxima dessas enzimas. A enzima DNA pol β -PAK de *T. brucei* funciona em concentrações ideais de KCl bem acima da sua paróloga, cerca de 200mM é sua concentração ótima. Essas enzimas possuem mecanismos de síntese muito parecidos (Steitz, 1998). Isso poderia explicar porque a maior parte dessas proteínas funciona com concentrações muito similares de sal.

Um outro sal relacionado ao processo de síntese é o $MgCl_2$. As DNA polimerases descritas até o momento precisam do íon Mg^{2+} como co-fator. Em essência, a reação de síntese constitui o ataque nucleofílico do 3'-OH do iniciador ao fosfato α do desoxinucleotídeo trifosfato que será incorporado. Seriam necessários dois íons metálicos para se alcançar a estrutura geométrica dessa reação. A TcDNA pol β também precisa desse co-fator e na sua ausência nenhuma atividade de síntese foi detectada. Já na concentração de $25\mu M$, a atividade dessa enzima cai drasticamente. Assim como o *T. cruzi*, tanto a enzima de *T. brucei* quanto a de *C. fasciculata* trabalham melhor em concentrações de $10\mu M$ (Saxowsky *et al.*, 2003). Mais uma vez, a TbDNA pol β -PAK mostra característica atípicas e funciona em concentrações de $15\mu M$, um pouco maior quando comparada a TbDNA pol β e a TcDNA pol β . O Mg^{2+} também é co-fator para diversas outras enzimas que interagem com o DNA como a fosfatase alcalina e também exonucleases. Estudos da estrutura dessas proteínas cristalizadas em presença desse íon sugerem um modelo de ligação em que são necessários dois íons, um envolvido no ataque nucleofílico e outro na formação de intermediários pentacovalentes necessários a reações (Steitz e Steitz, 1993). Não é surpreendente, portanto, que a TcDNA pol β requeira esse íon como co-fator e em concentrações similares a outras enzimas que interagem com DNA.

A maior parte das enzimas é influenciada pelo pH em que a reação acontece. Para as enzimas que fazem síntese de DNA, o pH é bastante influente também. No caso da Taq DNA pol, o pH ótimo varia entre 8,3 e 9,0 e, para a klenow, entre 7,2 e 7,9 (Segundo informações de catálogos). Aqui vimos que a TcDNA pol β tem como pH ótimo 7,0, embora ela possa funcionar em outros pH mais básicos. As proteínas homólogas em *T. brucei* e *C. fasciculata* funcionam em pH bem mais alto, por volta de 9,0 (Saxowsky *et al.*, 2003). Já a TbDNA pol β -PAK funciona bem em pH entre 7,0 e 9,0 (Saxowsky *et al.*, 2003).

Vários outros fatores que influenciam atividade enzimática foram analisados também, como desoxirribonucleotídeos, temperatura e tempo. Um dos principais substratos do processo de síntese de DNA são os desoxirribonucleotídeos trifosfato. Variando a concentração dos mesmos, foi possível observar uma variação na atividade da TcDNA pol β . Concentrações

muito baixas já são suficientes para que a essa enzima seja capaz de sintetizar DNA, entretanto, é em concentrações maiores, por volta dos 200 μ M, que a TcDNA pol β funciona melhor. A temperatura ótima de funcionamento dessa enzima é 37°C que é a temperatura corporal do homem. Em geral, a temperatura dos mamíferos varia entre 34-40°C. Portanto, funcionar bem na faixa dos 37°C pode indicar que essa enzima tem importância durante o processo de infecção do parasito desses hospedeiros. E, por fim, a atividade da enzima aumentou com o tempo sendo que duas horas foi o melhor tempo para a polimerização. Considerando-se a concentração da proteína, esse tempo foi um tempo razoável principalmente por que essa enzima insere apenas poucos nucleotídeos por vez.

Uma vez que as condições estavam padronizadas, testamos outros oligonucleotídeos para verificar a atividade da TcDNA pol β . Essa enzima é capaz de estender com bem mais facilidade molde de DNA formados apenas por adeninas e por timinas, sendo que diante de moldes contendo apenas citosinas ou repetições CA, sua atividade é bem menor. Em geral, a extensão de moldes contendo apenas adeninas é utilizada em ensaio de extensão obtendo-se bons resultados. Muitas das seqüências utilizadas nos ensaios de extensão eram compostas por repetições e enzimas que polimerizam DNA sentem dificuldades em replicar esse substrato. Isso explicaria a dificuldade em se sintetizar as repetições CA e de citosinas. Entretanto, não explicaria por que as repetições com adeninas e timinas são mais facilmente utilizadas como molde. O oligonucleotídeo utilizado nos ensaios com radioativo não possui natureza repetitiva e indicam que essa enzima consegue replicar também outros tipos de seqüência.

As DNA polimerases das famílias X e Y são conhecidas por serem enzimas susceptíveis a erros. Elas possuem uma alta taxa de mutação quando comparadas com outras enzimas e não tem nenhuma atividade revisora associada. Em geral, erros cometidos pela DNA pol β humana são corrigidos pela enzima AP endonuclease (Jiricny, 2002). Aqui, fomos capazes de mostrar que a TcDNA pol β é capaz de inserir desoxiguanina trifosfato diante de uma timina, na ausência de desoxiadenina trifosfato. Isso demonstra que ela possui um grande potencial para cometer erros durante o processo de replicação.

O *T. cruzi* possui mecanismos pouco conhecidos de escape do sistema imunológico. Um desses mecanismos pode ser a expressão de proteínas de membrana conhecida como mucinas. Essas proteínas são codificadas por uma família gênica denominada TcMUC que mostra uma grande variabilidade (Di Noia *et al.*, 1998). Essa família é dividida em dois grupos conhecidos como TcMUC I, que possui uma região hipervariável, e TcMUC II, em que a variabilidade é encontrada na região central da proteína. Buscaglia e colaboradores (2004) sugerem que, ao contrário de outros parasitos, o *T. cruzi* apresenta um grande repertório dessas proteínas em sua membrana como uma estratégia para escapar da vigilância do sistema imune. A região variável dessas proteínas não permitiria ao hospedeiro mamífero ter uma resposta apropriada uma vez que diminuiriam as chances de que um ligante único e principal se ligar ao complexo de histocompatibilidade dentro das células infectadas. Enzimas como a TcDNA pol β podem ter contribuído, ou mesmo podem contribuir, para o processo de geração do repertório de mucinas desse parasito. Um exemplo do envolvimento de DNA polimerases na geração de variabilidade é baseado na geração do repertório de anticorpos e receptores de linfócitos T do sistema imunológico dos próprios mamíferos. Nesse caso, a DNA pol θ pode fazer parte da maquinaria de replicação durante a replicação da região hipervariável dos anticorpos e seus erros poderiam inserir mutações gerando novos clones de linfócitos (Ukai *et al.*, 2006).

A TcDNA pol β possui um grande número de características em comum com suas homólogas em outros organismos. Entretanto, a função real dessa enzima só pode ser inferida pela sua localização celular que é um ponto extremamente divergente para os tripanossomatídeos. Estudos de imunofluorescência indicam uma localização nuclear para a DNA pol β de *L. infantum* (Taladriz *et al.*, 2001). Já a DNA pol β do *T. brucei* possui uma localização no cinetoplasto como demonstrado pela fusão dessa proteína com GFP. Nós tentamos produzir a DNA pol β em fusão com GFP e determinar sua localização em *T. cruzi*. Entretanto, embora não houvesse nenhuma mutação na seqüência dessa enzima, não foi possível detectar fluorescência nesses parasitos. Temos algumas pistas de que essa enzima pode ser nuclear. A análise de Western blot de extratos nucleares e citoplasmáticos indica que

essa proteína esta presente apenas na fração nuclear. Durante o processo de produção dos extratos, examinamos o lisado celular ao microscópio para verificar a eficiência desse processo. Não foram encontrados parasitos, indicando o processo de lise foi eficiente. Entretanto, a qualidade dos extratos só pode realmente ser testada por Western blot utilizando genes conhecidamente citoplasmáticos e nucleares. Tentaremos utilizar os mesmos anticorpos para fazer a localização por imunofluorescência da proteína em parasitos fixados para obtermos um resultado mais significativo. Caso esse resultado se confirme, assim como a enzima de *L. infantum*, a TcDNA pol β poderá ser descrita como uma enzima que participa do reparo de DNA nuclear, sendo uma enzima central no reparo por excisão de base. Ela seria responsável pelo preenchimento de espaços formados pela ação das DNA glicosilases e AP endonuclease. O reparo por excisão de base é uma das vias mais ativas na correção de lesões espontâneas formadas por produtos do metabolismo interno e, principalmente, na correção de lesões geradas pela perda espontânea da base do DNA que é o tipo de lesão celular mais comum.

A biologia molecular do *Trypanosoma cruzi*, bem como os outros parasitos de sua família, tem revelado um organismo muito interessante. Ele é um parasito digenético que apresenta como hospedeiros mamíferos e insetos da família dos triatomíneos. Seu ciclo de vida peculiar imprime sobre esse parasito um processo de seleção constante que pode ocorrer tanto nos hospedeiros insetos como mamíferos. Assim é de se imaginar que o mesmo passa por um constante processo de seleção e que, portanto, por um processo de evolução molecular constante. Aqui, caracterizamos dois genes ligados ao metabolismo de DNA que é uma das principais moléculas alvo desse processo. Os genes *TcRad51* e da TcDNA pol β podem contribuir intensamente para a evolução molecular por possuir características condizentes com a geração de variabilidade necessária para escape desse parasito das repostas imunológicas de seus hospedeiros. Por outro lado, esses genes são importantes também por manter a integridade do material genético desse organismo diante de processos lesivos. Assim, a geração de mutações e a manutenção da integridade genômica são processos aparentemente contraditórios, mas que podem ser alcançados por ambos os genes, dependendo da regulação da expressão e recrutamento dos produtos desses genes durante o processo de

replicação, reparo e recombinação. Esse trabalho representa a caracterização inicial desses genes. Outras contribuições ocorrerão com estudos no próprio parasito através do aumento da expressão desses genes ou pelo desligamento dos mesmos por nocaute e verificação de seus efeitos.

6. 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.
- ALONSO, A.; TERRADOS, G.; PICHER, A.J.; GIRALDO, R.; BLANCO, L.; LARRAGA, V. An intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in DNA polymerase beta from *Leishmania infantum* supports a role in DNA repair. *DNA Repair (Amst)*, v. 5, n. 1, p. 89-101, 2006.
- ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.R.; CHIARI, E.; PENA, S.D.; MACEDO, A.M. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol*, v. 100, n. 2, p. 163-72, 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.
- AUGUSTO-PINTO, L.; TEIXEIRA, S.M.; PENA, S.D.; MACHADO, C.R. Single-nucleotide polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. *Genetics*, v. 164, n. 1, p. 117-26, 2003.
- 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.
- BATTISTA, J.R.; EARL, A.M.; PARK, M.J. Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation? *Trends Microbiol*, v. 7, n. 9, p. 362-5, 1999.
- BEARD, W.A.; WILSON, S.H. Structure and mechanism of DNA polymerase Beta. *Chem Rev*, v. 106, n. 2, p. 361-82, 2006.

BERGOGLIO, V.; PILLAIRE, M.J.; LACROIX-TRIKI, M.; RAYNAUD-MESSINA, B.; CANITROT, Y.; BIETH, A.; GARES, M.; WRIGHT, M.; DELSOL, G.; LOEB, L.A.; CAZAUX, C.; HOFFMANN, J.S. Deregulated DNA polymerase beta induces chromosome instability and tumorigenesis. *Cancer Res*, v. 62, n. 12, p. 3511-4, 2002.

BERRIMAN, M.; GHEDIN, E.; HERTZ-FOWLER, C.; BLANDIN, G.; RENAULD, H.; BARTHOLOMEU, D.C.; LENNARD, N.J.; CALER, E.; HAMLIN, N.E.; HAAS, B; *et al.* The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, v. 309, n. 5733, p. 416-22, 2005.

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, 1999.

BRISSE, S.; BARNABE, C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol*, v. 30, n. 1, p. 35-44, 2000.

BRISSE, S.; HENRIKSSON, J.; BARNABE, C.; DOUZERY, E.J.; BERKVENS, D.; SERRANO, M.; DE CARVALHO, M.R.; BUCK, G.A.; DUJARDIN, J.C.; TIBAYRENC, M. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol*, v. 2, n. 3, p. 173-83, 2003.

BUSCAGLIA, C.A.; CAMPO, V.A.; DI NOIA, J.M.; TORRECILHAS, A.C.; DE MARCHI, C.R.; FERGUSON, M.A.; FRASCH, A.C.; ALMEIDA, I.C. The surface coat of the mammal-dwelling infective trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi* is formed by highly diverse immunogenic mucins. *J Biol Chem*, v. 279, n. 16, p. 15860-9, 2004.

BUSCAGLIA, C.A.; DI NOIA, J.M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect*, v. 5, n. 5, p. 419-27, 2003.

CANITROT, Y.; CAZAUX, C.; FRECHET, M.; BOUAYADI, K.; LESCA, C.; SALLES, B.; HOFFMANN, J.S. Overexpression of DNA polymerase beta in cell results in a mutator phenotype and a decreased sensitivity to anticancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, n. 21, p. 12586-90, 1998.

CANITROT, Y.; LAURENT, G.; ASTARIE-DEQUEKER, C.; BORDIER, C.; CAZAUX, C.; HOFFMANN, J.S. Enhanced expression and activity of DNA polymerase beta in chronic myelogenous leukemia. *Anticancer Res*, v. 26, n. 1B, p. 523-5, 2006.

CANO, M.I.; GRUBER, A.; VAZQUEZ, M.; CORTES, A.; LEVIN, M.J.; GONZALEZ, A.; DEGRAVE, W.; RONDINELLI, E.; ZINGALES, B.; RAMIREZ, J.L. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Molecular Biochem Parasitol*, v. 71, n. 2, p. 273-8, 1995.

CAPP, J.P.; BOUDSOCQ, F.; BERTRAND, P.; LAROCHE-CLARY, A.; POURQUIER, P.; LOPEZ, B.S.; CAZAUX, C.; HOFFMANN, J.S.; CANITROT, Y. The DNA polymerase lambda is required for the repair of non-compatible DNA double strand breaks by NHEJ in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, v. 34, n. 10, p. 2998-3007, 2006.

CHAGOVETZ, A.M.; SWEASY, J.B. PRESTON, B.D. Increased activity and fidelity of DNA polymerase beta on single-nucleotide gapped DNA. *J Biol Chem*, v. 272, n. 44, p. 27501-4, 1997.

DAROCHA, W.D.; SILVA, R.A.; BARTHOLOMEU, D.C.; PIRES, S.F.; FREITAS, J.M.; MACEDO, A.M.; VAZQUEZ, M.P.; LEVIN, M.J.; TEIXEIRA, S.M. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol Res*, v. 92, n. 2, p. 113-20, 2004.

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.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des*, v. 8, n. 4, p. 269-85, 2002.

DEMPLE, B.; SUNG, J.S. Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair. *DNA Repair (Amst)*, v. 4; n. 12, p. 1442-9, 2005.

DI NOIA, J.M.; D'ORSO, I.; ASLUND, L.; SANCHEZ, D.O.; FRASCH, A.C. The *Trypanosoma cruzi* mucin family is transcribed from hundreds of genes having hypervariable regions. *J Biol Chem*, v. 273, n. 18, p. 10843-50, 1998.

DIANOV, G.L.; PRASAD, R.; WILSON, S.H.; BOHR, V.A.; Role of DNA polymerase beta in the excision step of long patch mammalian base excision repair. *J Biol Chem*, v. 274, n. 20, p. 13741-3, 1999.

DIAS, J.C.; PRATA, A.; SCHOFIELD, C.J. Chagas' disease in the Amazon: an overview of the current situation and perspectives for prevention. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 35, n. 6, p. 669-78, 2002.

DONG, Z.; FASULLO, M. Multiple recombination pathways for sister chromatid exchange in *Saccharomyces cerevisiae*: role of RAD1 and the RAD52 epistasis group genes. *Nucleic Acids Res*, v. 31, n. 10, p. 2576-85, 2003.

DOS SANTOS, W.G.; BUCK, G.A. Simultaneous stable expression of neomycin phosphotransferase and green fluorescence protein genes in *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol*, v. 86, n. 6, p. 1281-8, 2000.

EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BARTHOLOMEU, D.C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A.N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E.A.; DELCHER, A.L.; BLANDIN, G. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, v. 309, n. 5733, p. 409-15, 2005.

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.

FERNANDES, O.; SOUTO, R.P.; CASTRO, J.A.; PEREIRA, J.B.; FERNANDES, N.C.; JUNQUEIRA, A.C.; NAIFF, R.D.; BARRETT, T.V.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R. Brazilian

isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am J Trop Med Hyg*, v. 58, n. 6, p. 807-11, 1998.

FREITAS, J.M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J.R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONCALVES, V.F.; TEIXEIRA, S.M.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, A.C.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; PENA, S.D. Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*, v. 2, n. 3, p. 226-35, 2006.

FRIEDBERG, E.C. The eureka enzyme: the discovery of DNA polymerase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 7, n. 2, p. 143-7, 2006.

GARDNER, M.J.; HALL, N.; FUNG, E.; WHITE, O.; BERRIMAN, M.; HYMAN, R.W.; CARLTON, J.M.; PAIN, A.; NELSON, K.E.; BOWMAN, S. *et al.* Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, v. 419, n. 6906, p. 498-511, 2002.

GEOGHEGAN, D.S.; SKINNER-ADAMS, T.; DAVIS, T.M. *Plasmodium falciparum*: isolate-specific radiosensitivity. *Exp Parasitol*, v. 99, n. 2, p. 108-10, 2001.

GU, H.; MARTH, J.D.; ORBAN, P.C.; MOSSMANN, H.; RAJEWSKY, K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*, v. 265, n. 5168, p. 103-6, 1994.

HAN, H.; BEARSS, D.J.; BROWNE, L.W.; CALALUCE, R.; NAGLE, R.B.; VON HOFF, D.D. Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray. *Cancer Res*, v. 62, n. 10, p. 2890-6, 2002.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, v. 166, n. 4, p. 557-80, 1983.

HARRIGAN, J.A.; BOHR, V.A. Human diseases deficient in RecQ helicases. *Biochimie*, v. 85, n. 11, p. 185-93, 2003.

- HARRIGAN, J.A.; OPRESKO, P.L.; VON KOBBE, C.; KEDAR, P.S.; PRASAD, R.; WILSON, S.H.; BOHR, V.A. The Werner syndrome protein stimulates DNA polymerase beta strand displacement synthesis via its helicase activity. *J Biol Chem*, v. 278, n. 25, p. 22686-95, 2003.
- HARRIGAN, J.A.; WILSON, D.M. 3RD; PRASAD, R.; OPRESKO, P.L.; BECK, G.; MAY, A.; WILSON, S.H.; BOHR, V.A. The Werner syndrome protein operates in base excision repair and cooperates with DNA polymerase beta. *Nucleic Acids Res*, v. 34, n. 2, p. 745-54, 2006.
- HUBSCHER, U. MAGA, G.; SPADARI, S. Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem*, v. 71, p. 133-63, 2002.
- INGHAM, D.J.; BEER, S.; MONEY, S.; HANSEN, G. Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *Biotechniques*, v. 31, n. 1, p. 132-4, 2001.
- IVANOV, E.L.; HABER, J.E. DNA repair: RAD alert. *Curr Biol*, v. 7, n. 8, p. 492-5, 1997.
- JIANG, C.Z.; YEN, C.N.; CRONIN, K.; MITCHELL, D.; BRITT, A.B. UV- and gamma-radiation sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, v. 147, n. 3, p. 1401-9, 1997.
- JIRICNY, J. An APE that proofreads. *Nature*, v. 415, n. 6872, p. 593-4, 2002.
- 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.
- KRISHNA, T.H.; MAHIPAL, S.; SUDHAKAR, A.; SUGIMOTO, H.; KALLURI, R.; RAO, K.S. Reduced DNA gap repair in aging rat neuronal extracts and its restoration by DNA polymerase beta and DNA-ligase. *J Neurochem*, v. 92, n. 4, p. 818-23, 2005.

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.

LEHNINGER, A.L. Principles of Biochemistry, 3ª Edição, Worth Publishers, 2001.

LIANG, F.; HAN, M.; ROMANIENKO, P.J.; JASIN, M. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, n. 9, p. 5172-7, 1998.

LIU, Y.; BEARD, W.A.; SHOCK, D.D.; PRASAD, R.; HOU, E.W.; WILSON, S.H. DNA polymerase beta and flap endonuclease 1 enzymatic specificities sustain DNA synthesis for long patch base excision repair. *J Biol Chem*, v. 280, n. 5, p. 3665-74, 2005.

LOUAT, T.; SERVANT, L.; ROLS, M.P.; BIETH, A.; TEISSIE, J.; HOFFMANN, J.S.; CAZAUX, C. Antitumor activity of 2',3'-dideoxycytidine nucleotide analog against tumors up-regulating DNA polymerase beta. *Mol Pharmacol*, v. 60, n. 3, p. 553-8, 2001.

MAACKKE, H.; JOST, K.; OPITZ, S.; MISKA, S.; YUAN, Y.; HASSELBACH, L.; LUTTGES, J.; KALTHOFF, H.; STURZBECHER, H.W. DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene*, v. 19, n. 23, p. 2791-5, 2000.

MAACKKE, H.; OPITZ, S.; JOST, K.; HAMDORF, W.; HENNING, W.; KRUGER, S.; FELLER, A.C.; LOPENS, A.; DIEDRICH, K.; SCHWINGER, E.; STURZBECHER, H.W. Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. *Int J Cancer*, v. 88, n. 6, p. 907-13, 2000.

MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D. Trypanosoma cruzi: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 99, n 1, p. 1-12, 2004.

MACHADO, C.A.; AYALA F.J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, n. 13, p. 7396-401, 2001.

MACHADO, C.A.; AYALA, F.J. () Sequence variation in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) and trypanothione reductase (TR) genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, v. 121, n. 1, p. 33-47, 2002.

MACHADO, C.R.; AUGUSTO-PINTO, L.; MCCULLOCH, R.; TEIXEIRA, S.M. DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. *Mutat Res*, v. 612, n. 1, p. 40-57, 2006.

MARTINEZ-CALVILLO, S.; LOPEZ, I.; HERNANDEZ, R. pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. *Gene*, v. 199, n. 1-2, p. 71-6, 1997.

MATSUMOTO, Y.; KIM, K. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science*, v. 269, n. 5224, p. 699-702, 1995.

MATTIMORE, V.; BATTISTA, J.R. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J Bacteriol*, v. 178, n. 3, p. 633-7, 1996.

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.

MCKEAN, P.G.; KEEN, J.K.; SMITH, D.F.; BENSON, F.E. Identification and characterisation of a RAD51 gene from *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*, v. 115, n. 2, p. 209-16, 2001.

MILES, M.A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SHAW, J.J.; LAINSON, R.; TOYE, P.J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*, v. 272, n. 5656, p. 819-21, 1978.

- MLADENOV, E.; ANACHKOVA, B.; TSANEVA, I. Sub-nuclear localization of Rad51 in response to DNA damage. *Genes Cells*, v. 11, n. 5, p. 513-24, 2006.
- 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.; ERDENIZ, N.; FENG, Q.; ROTHSTEIN, R. A molecular genetic dissection of the evolutionarily conserved N terminus of yeast Rad52. *Genetics*, v. 161, n. 2, p. 549-62, 2002.
- NAKAJIMA-SHIMADA, J.; AOKI, T. Inhibition by 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells and a possible mechanism of action. *Adv Exp Med Biol*, v. 431, p. 719-22, 1998.
- 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.
- O'DONNELL, M. Replisome architecture and dynamics in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, v. 281, n. 16, p. 10653-6, 2006.
- OLIVARES, M.; LOPEZ, M.C.; GARCIA-PEREZ, J.L.; BRIONES, P.; PULGAR, M.; THOMAS, M.C. The endonuclease NL1Tc encoded by the LINE L1Tc from *Trypanosoma cruzi* protects parasites from daunorubicin DNA damage. *Biochim Biophys Acta*, v. 1626, n. 1-3, p. 25-32, 2003.
- OLIVEIRA, R.P.; BROUDE, N.E.; MACEDO, A.M.; CANTOR, C.R.; SMITH, C.L.; PENA, S.D. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, n. 7, p. 3776-80, 1998.
- PARSONS, J.L.; DIANOVA, I.I.; ALLINSON, S.L.; DIANOV, G.L. DNA polymerase beta promotes recruitment of DNA ligase III alpha-XRCC1 to sites of base excision repair. *Biochemistry*, v. 44, n. 31, p. 10613-9, 2005.

- PAYS, E. The variant surface glycoprotein as a tool for adaptation in African trypanosomes. *Microbes Infect*, v. 8, n. 3, p. 930-7, 2006.
- PENA-DIAZ, J.; AKBARI, M.; SUNDHEIM, O.; FAREZ-VIDAL, M.E.; ANDERSEN, S.; SNEVE, R.; GONZALEZ-PACANOWSKA, D.; KROKAN, H.E.; SLUPPHAUG, G. *Trypanosoma cruzi* contains a single detectable uracil-DNA glycosylase and repairs uracil exclusively via short patch base excision repair. *J Mol Biol*, v. 342, n. 3, p. 787-99, 2004.
- PEREIRA, M. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. In: Wyler, D.J. (ed) Modern Parasite Biology – Cellular, Immunological and Molecular Aspects. W.H. Preeman and Company, New York, p 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.
- PETERMANN, E.; KEIL, C.; OEI, S.L. Roles of DNA ligase III and XRCC1 in regulating the switch between short patch and long patch BER. *DNA Repair (Amst)*, v. 5, n. 5, p. 544-55, 2006.
- PRASAD, R.; BATRA, V.K.; YANG, X.P.; KRAHN, J.M.; PEDERSEN, L.C.; BEARD, W.A.; WILSON, S.H. Structural insight into the DNA polymerase beta deoxyribose phosphate lyase mechanism. *DNA Repair (Amst)*, v. 4, n. 12, p. 1347-57, 2005.
- PROUDFOOT, C.; MCCULLOCH, R. Distinct roles for two RAD51-related genes in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Nucleic Acids Res*, v. 33, n. 21, p. 6906-19, 2005.
- 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.

REGIS-DA-SILVA, C.G. Clonagem e Caracterização funcional do gene *Rad51* de *Trypanosoma cruzi*, 01 de Março de 2002, 71 fls, Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

REHLING, P.; WIEDEMANN, N.; PFANNER, N.; TRUSCOTT, K.N. The mitochondrial import machinery for preproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, v. 36, n. 3, p. 291-336, 2001.

RODRIGUE, A.; LAFRANCE, M.; GAUTHIER, M.C.; MCDONALD, D.; HENDZEL, M.; WEST, S.C.; JASIN, M.; MASSON, J.Y. Interplay between human DNA repair proteins at a unique double-strand break *in vivo*. *EMBO J*, v. 25, n. 1, p. 222-31, 2006.

SAEFTEL M, FLEISCHER B, HOERAUF A. (2001). Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun*. 69(4):2252-9.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor, v.1-3, 1989.

SAXOWSKY, T.T.; CHOUDHARY, G.; KLINGBEIL, M.M.; ENGLUND. P.T. *Trypanosoma brucei* has two distinct mitochondrial DNA polymerase beta enzymes. *J Biol Chem*, v. 278, n. 49, p. 49095-101, 2003.

SCHMUÑIZ, G.A. A Tripanosomiase Americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: Brener, Z.; Andrade, Z.; Barral-Neto, M. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. (2^a. ed) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 2000.

SERVANT, L.; CAZAUX, C.; BIETH, A.; IWAI, S.; HANAOKA, F.; HOFFMANN, J.S. A role for DNA polymerase beta in mutagenic UV lesion bypass. *J Biol Chem*, v. 277, n. 51, p. 50046-53, 2002.

SHINOHARA, A.; OGAWA, H.; MATSUDA, Y.; USHIO, N.; IKEO, 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.

SILVA, J.S.; MACHADO, F.S.; MARTINS, G.A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Front Biosci*, v. 8, p. 314-25, 2003.

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.

SOBOL, R.W.; HORTON, J.K.; KUHN, R.; GU, H.; SINGHAL, R.K.; PRASAD, R.; RAJEWSKY, K.; WILSON, S.H. Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature*, v. 379, n. 6561, p. 83-6, 1996.

SOLINGER, J.A.; HEYER, W.D. Rad54 protein stimulates the postsynaptic phase of Rad51 protein-mediated DNA strand exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, n. 15, p. 8447-53, 2001.

SRIVASTAVA, D.K.; HUSAIN, I.; ARTEAGA, C.L.; WILSON, S.H. DNA polymerase beta expression differences in selected human tumors and cell lines. *Carcinogenesis*, v. 20, n. 6, p. 1049-54, 1999.

STEITZ, T.A.; STEITZ, J.A. A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 90, n. 14, p. 6498-502, 1993.

STEITZ, T.A. A mechanism for all polymerases. *Nature*, v. 391, n. 6664, p. 231-2, 1998.

SUKHANOVA, M.V.; KHODYREVA, S.N.; LEBEDEVA, N.A.; PRASAD, R.; WILSON, S.H.; LAVRIK, O.I. Human base excision repair enzymes apurinic/apyrimidinic endonuclease1 (APE1), DNA polymerase beta and poly(ADP-ribose) polymerase 1: interplay between strand-displacement DNA synthesis and proofreading exonuclease activity. *Nucleic Acids Res*, v. 33, n. 4, p. 1222-9, 2005.

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.

- SWEASY, J.B.; LOEB, L.A. Mammalian DNA polymerase beta can substitute for DNA polymerase I during DNA replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, v. 267, n. 3, p. 1407-10, 1992.
- TABOR, S.; RICHARDSON, C.C. A single residue in DNA polymerases of the *Escherichia coli* DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, n. 14, p. 6339-43, 1995.
- TAKATA, M.; SASAKI, M.S.; TACHIIRI, S.; FUKUSHIMA, T.; SONODA, E.; SCHILD, D.; THOMPSON, L.H.; TAKEDA, S. Chromosome Instability and Defective Recombinational Repair in Knockout Mutants of the Five Rad51 Paralogs. *Mol and Cell Biol*, v. 21, n. 8, p. 2858-2866, 2001.
- TALADRIZ, S.; HANKE, T.; RAMIRO, M.J.; GARCIA-DIAZ, M.; GARCIA, D.E.; LACOBIA, M.; BLANCO, L.; LARRAGA, V. Nuclear DNA polymerase beta from *Leishmania infantum*. Cloning, molecular analysis and developmental regulation. *Nucleic Acids Res*, v. 29, n. 18, p. 3822-34, 2001.
- THACKER, J. The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett*, v. 219, n. 2, p. 125-35, 2005.
- THOMPSON, L.H.; SCHILD, D. Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res*, v. 477, n. 1-2, p. 131-53, 2001.
- THORPE, P.H.; MARRERO, V.A.; SAVITZKY, M.H.; SUNJEVARIC, I.; FREEMAN, T.C.; ROTHSTEIN, R. Cells expressing murine RAD52 splice variants favor sister chromatid repair. *Mol Cell Biol*, v. 26, n. 10, p. 3752-63, 2006.
- TORRI, A.F.; KUNKEL, T.A.; ENGLUND, P.T. A beta-like DNA polymerase from the mitochondrion of the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *J Biol Chem*, v. 269, n. 11, p. 8165-71, 1994.

- TORRI, A.F.; ENGLUND, P.T. A DNA polymerase beta in the mitochondrion of the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *J Biol Chem*, v. 270, n. 8, p. 3495-7, 1995.
- UKAI, A.; MARUYAMA, T.; MOCHIZUKI, S.; OUCHIDA, R.; MASUDA, K.; KAWAMURA, K.; TAGAWA, M.; KINOSHITA, K.; SAKAMOTO, A.; TOKUHISA, T.; O-WANG, J. Role of DNA polymerase theta in tolerance of endogenous and exogenous DNA damage in mouse B cells. *Genes Cells*, v. 11, n. 2, p. 111-21, 2006.
- URBINA, J.A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; LIRA, R.; ROMANHA, A.J. In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents*, v. 21, n. 1, p. 27-38, 2003.
- VAN VEELLEN, L.R.; ESSERS, J.; VAN DE RAKT, M.W.; ODIJK, H.; PASTINK, A.; ZDZIENICKA, M.Z.; PAULUSMA, C.C.; KANAAR, R. Ionizing radiation-induced foci formation of mammalian Rad51 and Rad54 depends on the Rad51 paralogs, but not on Rad52. *Mutat Res*, v. 574, n. 1-2, p. 34-49, 2005.
- VELOSO, V.M.; CARNEIRO, C.M.; TOLEDO, M.J.; LANA, M.; CHIARI, E.; TAFURI, W.L.; BAHIA, M.T. Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parental strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 7, p. 1005-11, 2001.
- VISPE, S.; CAZAUX, C.; LESCA, C.; DEFAIS, M. Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res*, v. 26, n. 12, p. 2859-64, 1998.
- WELCH, D.M.; MESELSON, M. Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science*, v. 288, n. 5469, p. 1211-5, 2000.
- WILSON, S.H.; KUNKEL, T.A. Passing the baton in base excision repair. *Nat Struct Biol*, v. 7, n. 3, p. 176-8, 2000.

WU, X.; TAKENAKA, K.; SONODA, E.; HOCHEGGER, H.; KAWANISHI, S.; KAWAMOTO, T.; TAKEDA, S.; YAMAZOE, M. Critical roles for polymerase zeta in cellular tolerance to nitric oxide-induced DNA damage. *Cancer Res*, v. 66, n. 2, p. 748-54, 2006.

XIA, S.J.; SHAMMAS, M.A.; SHMOOKLER REIS, R.J. Elevated recombination in immortal human cells is mediated by HsRAD51 recombinase. *Mol Cell Biol*, v. 17, n. 12, p. 7151-8, 1997.

YANEZ, R.J.; PORTER, A.C. Differential effects of Rad52p overexpression on gene targeting and extrachromosomal homologous recombination in a human cell line. *Nucleic Acids Res*, v. 30, n. 3, p. 740-8, 2002.

YEO, M.; ACOSTA, N.; LLEWELLYN, M.; SANCHEZ, H.; ADAMSON, S.; MILES, G.A.; LOPEZ, E.; GONZALEZ, N.; PATTERSON, J.S.; GAUNT, M.W.; DE ARIAS, A.R.; MILES, M.A. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol*, v. 35, n. 2, p. 225-33, 2005.

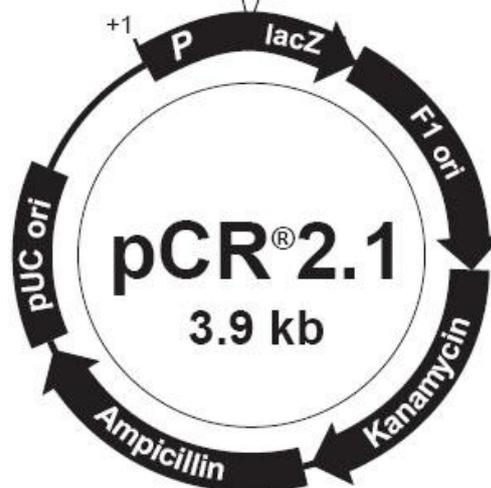
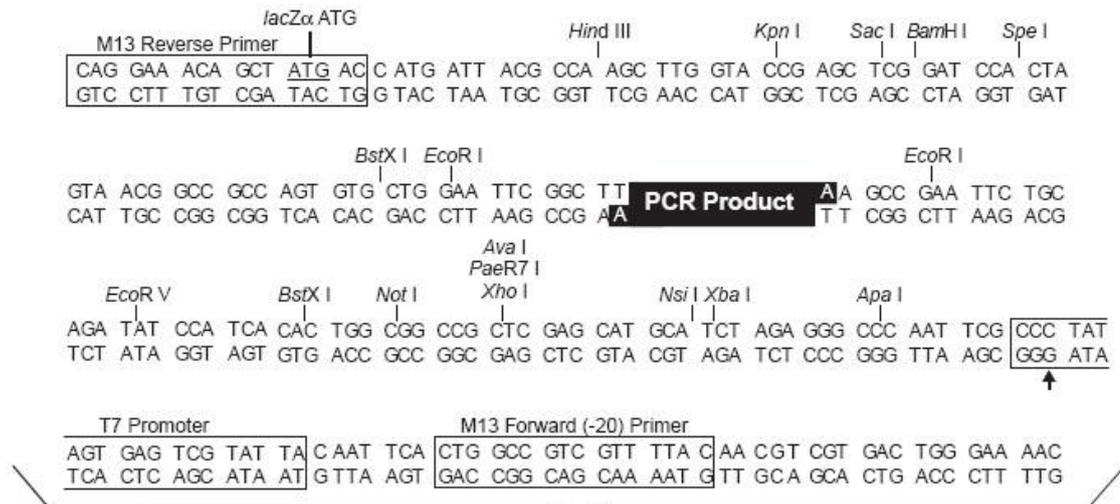
YONETANI, Y.; HOCHEGGER, H.; SONODA, E.; SHINYA, S.; YOSHIKAWA, H.; TAKEDA, S.; YAMAZOE, M. Differential and collaborative actions of Rad51 paralog proteins in cellular response to DNA damage. *Nucleic Acids Res*, v. 33, n. 14, p. 4544-52, 2005.

YUAN, S.S.; CHANG, H.L.; LEE, E.Y. Ionizing radiation-induced Rad51 nuclear focus formation is cell cycle-regulated and defective in both ATM(-/-) and c-Abl(-/-) cells. *Mutat Res*, v. 525, n. 1-2, p. 85-92, 2003.

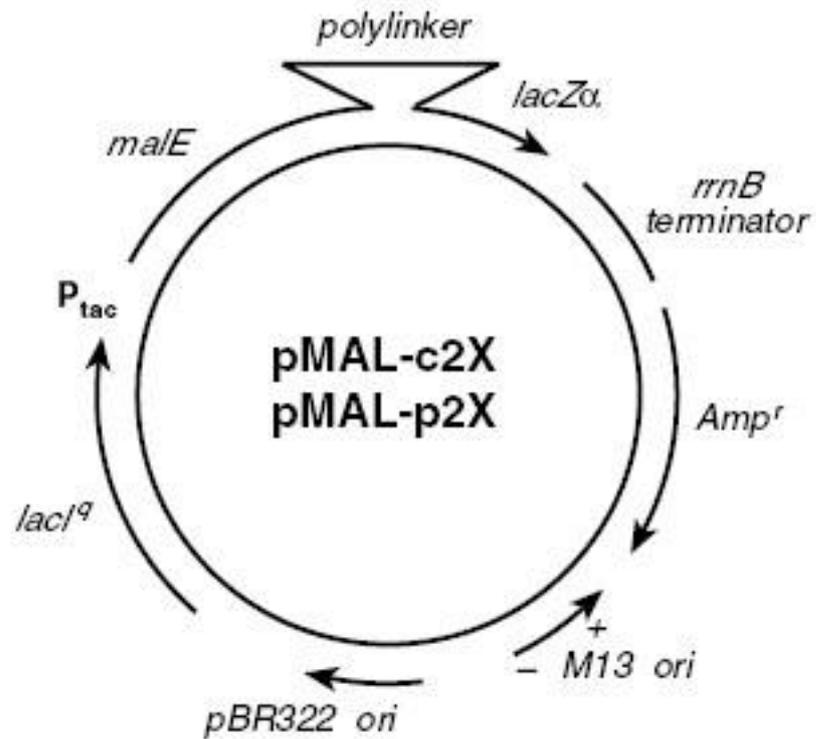
ZINGALES, B.; STOLF, B.S.; SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; BRIONES, M.R. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94, Supl 1, p. 159-64, 1999.

7. Anexo I

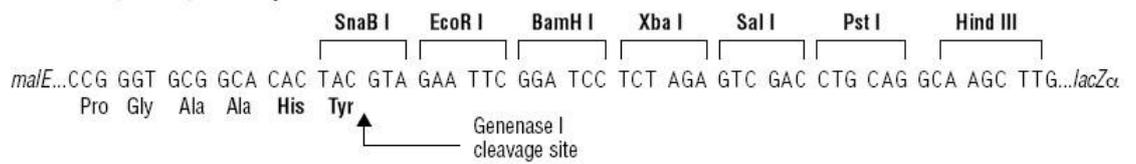
1. pCR2.1 – Invitrogen



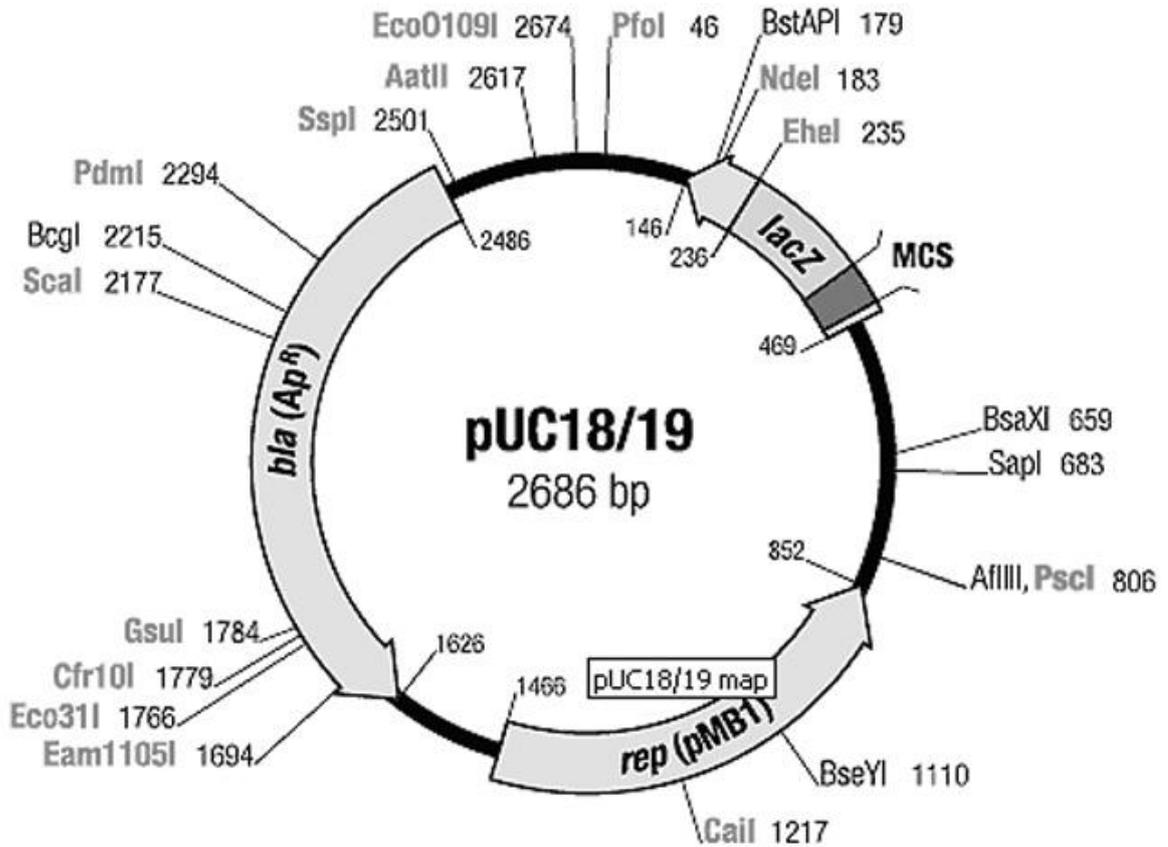
2. pMAL-c2-Genenase – New England Biolabs



pMAL-c2G, pMAL-p2G Polylinker



3. pUC18 – GE Healthcare



pUC18

M13/pUC sequencing primer (-20, 17-mer) → 399 HindIII PaeI PstI SdaI BspMI Acl HincII SbfI XbaI BamHI Cfr9I Eco88I SmaI Acc65I KpnI Eco136II Eco24I SacI Apol EcoRI 455

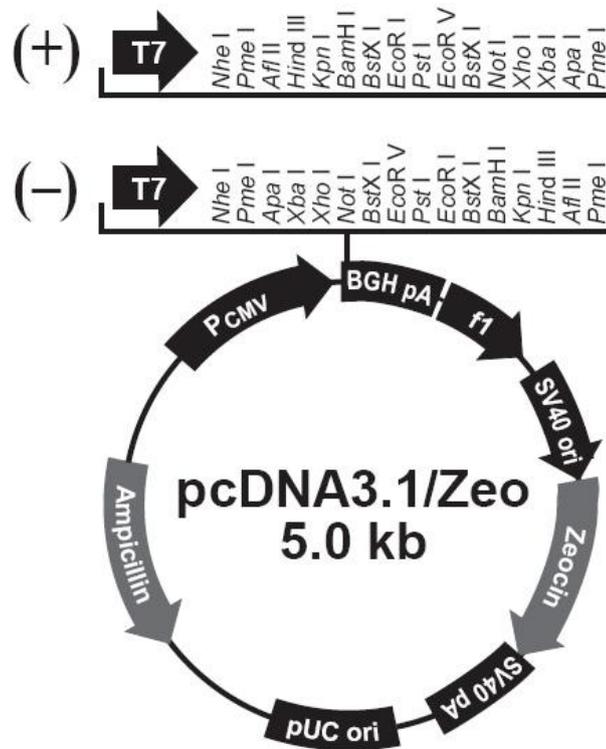
5' GTAA AAC GAC GGCCAGTGC CAA GCT TGC ATG CCT GCA GGT CGA CTC TAG AGG ATC CCC GGG TAC CGA GCT CGA ATT CGT AAT CAT GGT CAT AGC TGT TTC CTG 3'

3' CATT TTG CTG CCGGTC ACGGTT CGA ACG TAC GGA CGT CCA GCT GAG ATC TCC TAG GGG CCC ATG GCT CGA GCT TAA GCA TTA GTA CCA GTA TCG ACA AAGGAC 5'

LacZ ← Val Val Ala Leu Ala Leu Ser Ala His Arg Cys Thr Ser Glu Leu Pro Asp Gly Pro Val Ser Ser Ser Asn Thr Ile Met Thr Met

← M13/pUC reverse sequencing primer (-26, 17-mer)

4. pcDNA 3.1/Zeo (+) – GE Healthcare



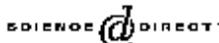
8. Anexo II

+ Medel

ARTICLE IN PRESS



Available online at www.sciencedirect.com



Molecular & Biochemical Parasitology xxx (2006) xxx–xxx

MOLECULAR
& BIOCHEMICAL
PARASITOLOGY

Characterization of the *Trypanosoma cruzi* *Rad51* gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation[☆]

Carlos Gustavo Regis-da-Silva^a, Jorge Marcelo Freitas^a, Danielle Gomes Passos-Silva^a, Carolina Furtado^a, Luiz Augusto-Pinto^a, Márcio Tadeu Pereira^a, Wanderson Duarte DaRocha^a, Glória Regina Franco^a, Andréa Mara Macedo^a, Jean-Sebastien Hoffmann^b, Christophe Cazaux^b, Sérgio Danilo Junho Pena^a, Santuza Maria Ribeiro Teixeira^a, Carlos Renato Machado^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Immunology, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Caixa Postal 486, Belo Horizonte 30161-970, MG, Brazil

^b Group "Genetic Instability and Cancer", Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, CNRS UMR 5089, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex, France

Received 8 November 2005; received in revised form 26 May 2006; accepted 30 May 2006

Abstract

The *Rad51* gene encodes a highly conserved enzyme involved in DNA double-strand break (DSB) repair and recombination processes. We cloned and characterized the *Rad51* gene from *Trypanosoma cruzi*, the protozoan parasite that causes Chagas disease. This gene is expressed in all three forms of the parasite life cycle, with mRNA levels that are two-fold more abundant in the intracellular amastigote form. The recombinase activity of the *TcRad51* gene product was verified by an increase in recombination events observed in transfected mammalian cells expressing *TcRad51* and containing two inactive copies of the neomycin-resistant gene. As a component of the DSB repair machinery, we investigated the role of *TcRad51* in the resistance to ionizing radiation and zeocin treatment presented by *T. cruzi*. When exposed to gamma irradiation, different strains of the parasite survive to dosages as high as 1 kGy. A role for *TcRad51* in this process was evidenced by the increased expression of its mRNA after irradiation. Furthermore, transfected parasites over-expressing *TcRad51* have a faster kinetics of recovery of the normal pattern of chromosomal bands after irradiation as well as a higher resistance to zeocin treatment than do wild-type cultures.
© 2006 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Recombination; *Trypanosoma cruzi*; RAD51; Ionizing radiation

1. Introduction

Trypanosoma cruzi is a human parasite that has a preferential asexual reproduction with rare events of sexual exchange [1,2]. Because of the accumulation of mutations, sexual reproduction in diploid taxa should eventually result in high levels of heterozygosity [3]. However, studies of genomic sequences have shown that in most strains, the *T. cruzi* genome is highly homozygous [4,5]. This is in contrast with the high heterozygosity found in

the genome of the clone CL Brener, the reference strain chosen for the genome sequencing project [6]. The two distinct haplotypes found throughout most of the CL Brener genome is consistent with data from several laboratories indicating that some *T. cruzi* strains contain, in fact, hybrid genomes. On the other hand, the high level of homozygosity found in the vast majority of *T. cruzi* strains can be explained by the occurrence of highly active mitotic recombination and/or genetic conversion events. The characterization of genes involved in homologous recombination (HR) may help us to better understand the *T. cruzi* population structure and the role of DNA recombination machinery in the turnover of the parasite genome. The present study on the characterization of the *T. cruzi Rad51* gene represents the first step towards this goal.

[☆] Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™ database under the accession number DQ166205.

* Corresponding author. Tel.: +55 31 34992628; fax: +55 31 34992984.

E-mail address: crmachad@icb.ufmg.br (C.R. Machado).

The protein RAD51 has a pivotal function in homologous recombination and repair of DNA double-strand breaks (DSB). Studies with the *Escherichia coli* homologue (RecA), show that, similarly to eukaryotic RAD51, it binds cooperatively to DNA to form helical nucleoprotein filaments that mediate pairing and strand exchange between homologous DNA molecules. The involvement of yeast and mammalian RAD51 in DSB repair has been evidenced in studies of resistance to ionizing radiation (IR), a DSB inducer [7]. Homologous recombination is the most conservative of the three processes responsible for DSB repair (which also includes non-homologous end joining and single-strand annealing) and seems to be more predominant in lower eukaryotes [8]. The DSB repair process begins when the ends of the break point are processed in the 5' to 3' direction leaving a protruding 3' end ssDNA. The single-strand binding protein RPA coats this ssDNA. Invasion of a homologous duplex DNA is promoted by RAD51 after its association with RPA-coated DNA [7].

The characterization of the *Rad51* gene in *Trypanosoma brucei* demonstrated the importance of homologous recombination in antigenic variation, a mechanism that allows the parasite to escape immune killing mediated by antibodies directed against the variant surface glycoproteins, or VSGs [9]. Similar to other unicellular organisms, the disruption of *Rad51* in *T. brucei* is not lethal, but results in a higher sensitivity to genotoxic agents that cause DSB and in an impaired ability to undergo VSG switching [9]. The *Rad51* gene has also been identified and characterized in *Leishmania major*. Its product is able to bind to DNA and exhibit DNA-stimulated ATPase activity. It has also been shown that the levels of LmRAD51 increase after the treatment with genotoxic agents [10].

In this paper, we described the cloning and characterization of the *T. cruzi Rad51* gene and investigated its role in DNA recombination. We amplified a DNA fragment containing the *TcRad51* open reading frame (ORF) and tested its activity *in vivo* using CHO cells containing a recombinogenic substrate. By over-expressing *TcRad51* in *T. cruzi* epimastigotes, we also found that the activity of TcRAD51 in DSB repair may be responsible for the parasite resistance to ionizing radiation.

2. Materials and methods

2.1. Parasite cultures, γ -irradiation and zeocin treatment

All *T. cruzi* strains or cloned stocks were provided by Dr. Égler Chiari, Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Epimastigote cultures were maintained at 28 °C, pH 7.3, in BHI medium (33 g/L brain–heart infusion, 3 g/L tryptose, 0.02 g/L hemin, 0.4 g/L KCl, 4 g/L Na₂HPO₄ and 0.3 g/L glucose) supplemented with complement-inactivated 10% fetal bovine serum, streptomycin sulfate (0.2 g/L), and penicillin (200,000 units/L). Cultures with 3×10^5 parasites were exposed to a cobalt (⁶⁰Co) irradiator with a dose of 1578 Gy/h or treated with different concentrations of zeocin (Invitrogen). After cultivating the treated cultures for various periods, cells were counted in a cytometric chamber.

2.2. DNA and RNA purification

Total DNA was prepared from *T. cruzi* epimastigotes by the proteinase K-phenol/chloroform extraction method according to previously described protocols [11]. Parasite RNA was purified from the different developmental stages [obtained as described [11]] using the RNAeasy kit (Qiagen), according to manufacturer's instructions.

2.3. Cloning procedures

The proofreading Pfu DNA polymerase (Stratagene) was used in PCR amplifications of the *TcRad51* gene using 5' (Tcrad51.10; ATGAACACCCGCTCCAAGAG) and 3' (TAGA-TCAATCCCTTGCATCCCCAA) primers flanking the *Rad51* ORF. Amplicons were cloned into pGEM-T Easy vector (Promega) and the recombinant plasmids were recovered by alkaline lysis using the Wizard Plus SV Miniprep kit (Promega).

2.4. DNA sequencing and analyses

DNA sequencing reactions were prepared using the dye terminator kit and generated using the MegaBace 1000 automated sequencer (GE Healthcare). Sequence alignments and homology searches were performed using the BLAST [12] programs as well as the MultAlin interface [13].

2.5. Northern and Southern blot analysis

For Northern blot analysis, 10 μ g of RNA were size-fractionated in 1.2% agarose gels containing 5% formaldehyde, blotted onto a Hybond-N⁺ membrane (GE Healthcare) by capillary transfer and fixed through UV irradiation. A cDNA probe corresponding to the *TcRad51* gene was PCR amplified, gel purified and labeled with [α -³²P]dCTP using the MegaprimeTM DNA labeling protocol from GE Healthcare. The membrane was hybridized in a 50% formamide buffer for 18 h at 42 °C and washed with $2 \times$ SSC/0.1% SDS at 60 °C, as previously described [11].

For Southern blot hybridization, total DNA of *T. cruzi* purified from epimastigote cultures was digested with the restriction endonucleases *Eco*RI, *Hind*III and *Pst*I (New England Biolabs), size-fractionated by electrophoresis in 0.8% agarose gel and transferred to a Hybond-N⁺ membrane (GE Healthcare). The membrane was hybridized to the same [α -³²P]dCTP (GE Healthcare) labeled cDNA probe. Hybridization and washing steps were carried out as described for Northern blot analysis.

2.6. Real-time RT-PCR analyses

One microgram of total *T. cruzi* RNA, quantified by capillary electrophoresis (RNA 6000 nanochips kit, Agilent), was used in first strand cDNA synthesis reactions using the SuperScriptTM II reverse transcriptase kit (Invitrogen) and oligo(dT)_{12–18} primer, following the manufacturer's instructions. Control reactions without reverse transcriptase were also performed to determine

the presence of contaminating genomic DNA in the RNA samples. The levels of expression of *TcRad51* were determined by real-time PCR using the product of cDNA synthesis reactions as template in a real-time PCR apparatus (ABI7900—Applied Biosystems). The reactions were performed with SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) with 0.25 μ M each of *TcRad51.40* (GTGCCCTCGTGGTAAACC) and *Tcr51.31* (CGGGATGAACCCATT) primers. After two initial steps of 50 °C for 5 min (to activate the ampUNG) and 95 °C for 10 min (to inactivate the ampUNG and activate TaqGOLD), 40 cycles of 60 and 95 °C for 1 min each were carried out. The constitutively expressed *GAPDH* gene was used as calibrator. All samples were tested in duplicates in two independent real-time experiments. The quality of real-time PCR amplicons was checked by the dissociation curves tool available in the ABI 7900. For the determination of the relative amount of *TcRad51*, the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used as described [14].

2.7. PFGE

Epimastigotes were included in agarose blocks as reported by Engman et al. [15]. Pulse field gel electrophoresis (PFGE) was carried out as described by Cano et al. [16] with the following modifications: the chromosomes were separated in 0.8% agarose gels using a program with five phases of homogeneous pulses (north/south, east/west) with interpolation for 135 h at 83 V. Phase 1 had pulse time of 90 s (run time 30 h); phase 2, 200 s (30 h); phase 3, 350 s (25 h); phase 4, 500 s (25 h); phase 5, 800 s (25 h). Chromosomes from *Hansenula wingei* (Bio-Rad) were used as molecular mass standards. After ethidium bromide staining, the bands were quantified by densitometry.

2.8. In vivo recombination assay

DRA10 CHO cells (provided by B. Lopez, CEA, France) were grown in MEM alpha (Gibco) medium supplemented with 10% calf serum, penicillin and streptomycin. The *TcRad51* gene was PCR-amplified using the primers *Rad51Xho* (CCGCTCGAGATG AACACCCGCTCCAAGAG) and *Rad51Xba* (CTAGTCTAGATCAATCCCTTGCAT CCCCAA). After digesting the PCR product with *XhoI* and *XbaI*, it was inserted into the pcDNA3.1 mammalian expression vector (Invitrogen), generating pcDNA3.1-*TcRAD51* (pTrad). Transfection of DRA10 CHO cells was performed using JetPEI (QBiogen) and selection medium contained 100 μ g zeocin/mL (Cayla, France). *TcRad51* over-expression in DRA10 CHO cells was checked by RT-PCR real-time experiments. After selection of stable clones, 10^6 transfected cells were plated and incubated for 10 days in media containing 1 mg G418/mL. Resistant colonies were stained with crystal violet and colonies containing more than 50 cells were scored. The recombination rate was calculated by determining the plating efficiency of 300 transfected cells in drug-free medium. The experiments were made using three clones derived from transfected cultures with five replicates for each clone.

2.9. Parasite transfections

A *T. cruzi* expression vector derived from pROCKGFPNeo [17] was generated by replacing the neomycin resistance gene with the hygromycin gene. The plasmid pROCKRad51Hygro was then constructed by replacing the GFP coding region with *TcRad51* after digesting pROCKGFPHygro with *XbaI* and *XhoI*, and ligating in the *TcRad51* PCR product containing *XbaI* and *XhoI* sites. pROCKRad51Hygro was linearized by digestion with *NotI* and transfected by electroporation into epimastigote cultures of the CL Brener strains according to the protocol described by DaRocha et al. [17]. Transfected parasites were selected after 4 weeks of culturing in the presence of 200 μ g hygromycin/mL.

3. Results

3.1. Characterization of the *T. cruzi* *Rad51* gene

Oligonucleotide primers based on *T. cruzi* EST sequences were used to PCR amplify the complete *Rad51* coding region from DNA isolated from *T. cruzi* Tulahuén strain. A single PCR product of 1116 bp was cloned into pGEM-T easy vector, and its sequence determined (GenBank accession number: DQ166205). Fig. 1 shows an alignment of the 371-amino acid *T. cruzi* RAD51, designated TcRAD51 (from Tulahuén strain), with other RAD51 proteins. TcRAD51 shares 73% identity (77% similarity) with *L. major* and *Leishmania donovani* RAD51; 69% identity (75% similarity) with *T. brucei* RAD51; 63% identity (74% similarity) with *Homo sapiens* RAD51; 57% identity (73% similarity) with *Schizosaccharomyces pombe* RAD51; 54% identity (69% similarity) with *Saccharomyces cerevisiae* RAD51. Analyses of functional domains in the deduced amino acid sequence identified several protein motifs, including DNA binding (helix–hairpin–helix) and ATP binding domain as well as a 8-amino acid motif conserved in different recombinases [9] (Fig. 1).

Fig. 2A shows a Southern blot of *T. cruzi* genomic DNA from epimastigote cultures of the Colombiana (Col.1.7G2) and CL Brener strains, which belong to the *T. cruzi* I and II lineages, respectively, the two main lineages identified in *T. cruzi* populations [4,5]. Parasite DNA was digested with *EcoRI*, *HindIII* and *PstI*, and hybridized with full-length *TcRad51* probe. Since the *TcRad51* sequence contains one cleavage site each for *EcoRI* and *PstI* and no site for *HindIII*, the result shown in Fig. 2A suggests the presence of a single-copy gene in the homozygous Colombiana strain. In contrast, the CL Brener strain has been shown previously to possess two heterozygous genomes [6] and the result in Fig. 2A is consistent with the presence of a single-copy *TcRAD51* gene in CL Brener that displays heterogeneity of sequence in the two genomes.

As shown in Fig. 2B, Northern blot performed with RNA isolated from the three stages of the parasite's life cycle (epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes) shows a 1700-nucleotide transcript that is constitutively expressed in *T. cruzi*. Real-time RT-PCR indicates that its level is 2.6-fold greater in amastigotes than in epimastigotes.

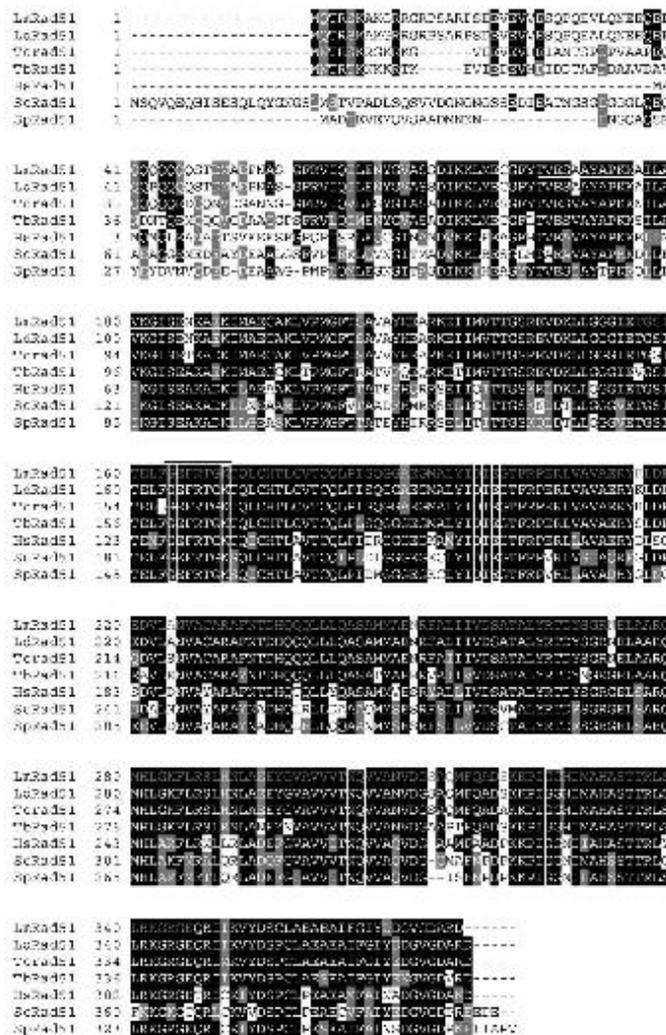


Fig. 1. RAD51 protein alignment. RAD51 protein sequences from *T. cruzi* (TcRad51), *L. major* (LmRad51), *L. donovani* (LdRad51), *T. brucei* (TbRad51), *H. sapiens* (HsRad51), *S. cerevisiae* (ScRad51) e *Saccharomyces pombe* (SpRad51) were aligned with MultAlin interface [13]. Black shaded indicates conserved amino acids in all aligned RAD51 proteins. Gray shaded indicates conserved amino acids. White boxes show aminoacids that are conserved in 23 RecA proteins. Gray letters indicate amino acids encompassing the classical ATP binding domain found in a variety of proteins. Underlined letters show amino acids that form a helix-hairpin-helix DNA binding motif. Line over the letters shows the Walker A ATP/GTP binding motif.

3.2. Functional characterization of TcRad51

To investigate whether the *TcRad51* gene encodes a protein that has a recombinase activity we transfected the pTrad plasmid, a mammalian expression vector containing the *Rad51* gene and zeocin resistance gene, into a CHO DRA10 cell line that contains a unique copy of an intra-chromosomal recombination

substrate. This substrate is composed of two inactive copies of the neomycin-resistance gene, which can be restored if an intra-chromosomal event of homologous recombination takes place. Cells presenting a functional neomycin gene are thus identified with a selective medium containing G418 [18]. Three clones of stably transfected cells constitutively expressing *TcRad51* (TcRad51.9) were compared to three clones derived from cells

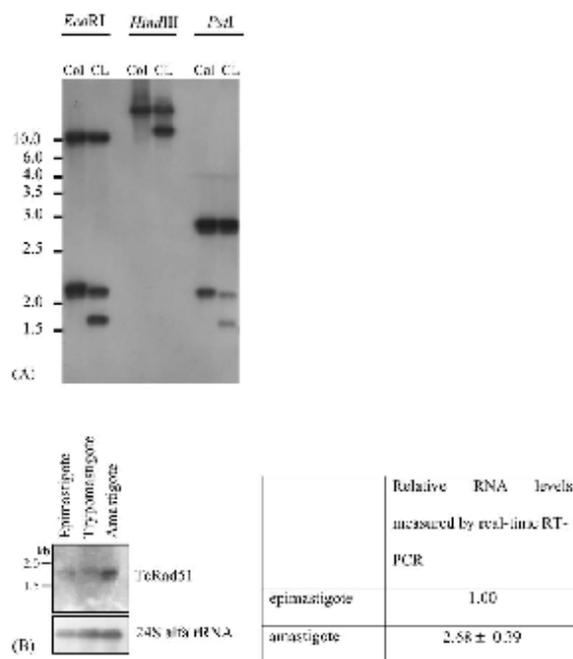


Fig. 2. Gene copy number and mRNA expression of *TcRad51*. (A) Southern blot analysis of the *TcRad51*. *T. cruzi* genomic DNAs isolated from the Colombian (Col) and CL Brener (CL) strains and digested with *EcoRI*, *HindIII* and *PstI* were probed with the complete coding region of the *TcRad51* gene. (B) Northern blot analysis of *TcRad51* with total RNA extracted from amastigote, trypomastigote and epimastigote forms. The same blot was re-probed with a fragment of *T. cruzi* 24S rRNA gene (bottom). The table shows mRNA quantification obtained by real-time RT-PCR analysis.

transfected with the empty vector (pcDNA3) by scoring the number of G418 resistant colonies. As shown in Fig. 3, the number of recombinant clones resistant to G418 increased about six-fold in the transfected population encoding the *TcRad51* compared to DRA10 cells transfected with the pcDNA3 vector.

3.3. Treatment of *T. cruzi* cultures with ionizing radiation

Since RAD51 activity is associated with DSB repair, we investigated the response of three *T. cruzi* strains to increasing doses of gamma radiation, which is known to generate DSBs. As shown in Fig. 4A, all three strains have a high survival rate even in the presence of an ionizing radiation dose as large as 1000 Gy (about 50% survival). This high rate of survival is not due to the selection of a sub-population of resistant cells since the irradiated cultures, when exposed again to same dose, had the same survival rate as the original population (data not shown).

To investigate whether recombination events were involved in this high survival rate of the *T. cruzi* strains, the expression of *TcRad51* was determined in the CL Brener strain after exposure to a 500 Gy dose of gamma radiation. As shown in Fig. 4B, 4 h after the irradiation treatment a four-fold increase in the level of *TcRad51* mRNA was observed and after 24 h, a two-fold increase was detected.

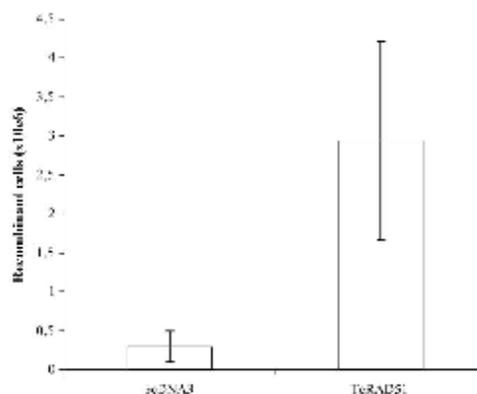


Fig. 3. Recombination assay in CHO DRA10 cells. Transfected cells with *TcRAD51* gene or with the empty plasmid (pcDNA3) were plated and incubated for 10 days in media containing 1 mg G418/mL. Resistant colonies were scored. The experiments were made with three clones and five replicates for each clone.

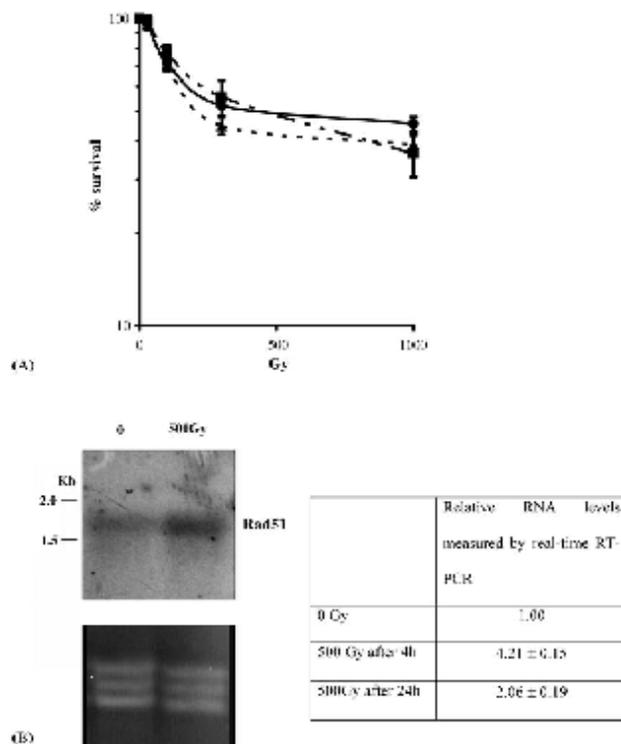


Fig. 4. *T. cruzi* response to ionizing radiation. (A) Survival of *T. cruzi* CL Brener (circles), JG (triangles) and Colombiana (squares) strains following ionizing radiation. Epimastigote cultures were exposed for different times to a source of gamma rays at a 1.5 kGy/h rate and after 5 days parasite survival was determined by counting viable cells. (B) Northern blot analysis of RNA extracted from parasite cultures (CL Brener) following gamma irradiation. Total mRNA was extracted and hybridized to a *TcRad51* probe. The table shows mRNA quantification obtained by real-time RT-PCR analysis.

Immediately after irradiation, *T. cruzi* cells ceased dividing for approximately 240 h before returning to the same cell density as a non-irradiated culture (Fig. 5A). This growth arrest can be associated with DSBs, as suggested by the analysis of *T. cruzi* chromosomes in PFGE, which revealed a clear pattern of DNA fragmentation immediately after irradiation. However, as early as 48 h after irradiation, normal sized chromosomal bands were again detected (Fig. 5B).

3.4. Resistance to ionizing radiation of *T. cruzi* cells over-expressing TcRAD51

The recovery of chromosomal bands observed after gamma irradiation are likely due to an efficient process of recombination repair in irradiated parasites. To ascertain the role of *TcRad51* in this process, we generated a *T. cruzi* cell line over-expressing the *TcRad51* gene using the pROCKRad51Hygro expression vector. Real-time RT-PCR determinations showed that the transfected epimastigotes expressed two-fold more *TcRad51* mRNA than wild-type parasites (Fig. 6A). The increased activity of

RAD51 in the transfected cells was tested by comparing the response to zeocin treatment, a drug that causes double-strand breaks in DNA [19]. Using different concentrations of this drug, it was shown that transfected *T. cruzi* cells over-expressing TcRAD51 present a higher resistance to zeocin than wild-type cells (Fig. 6B).

We next investigated the response to irradiation by cells over-expressing TcRAD51. Fig. 7A shows that these cells have similar growth kinetics as wild-type cells, i.e., a transient arrest in cell growth followed by a recovery of the normal cell proliferation rate. However, after exposure to 500 Gy doses of gamma irradiation, the cells over-expressing TcRAD51 are able to overcome the growth arrest much faster than wild-type cells. As indicated by the pattern of chromosomal bands shown in Fig. 7B, this faster recovery of growth is likely due to a faster DNA repair response using the recombination pathway. Irradiated cells over-expressing TcRAD51 restore a DNA pattern in PFGE similar to non-irradiated cells as soon as 24 h in culture, whereas wild-type cells showed the normal DNA pattern only after 48 h.

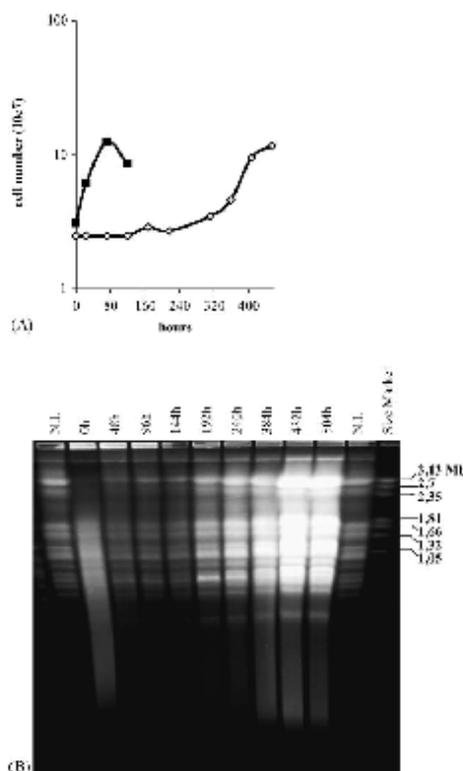


Fig. 5. (A) Growth curves of *T. cruzi* after exposure to ionizing radiation. Number of cultured parasite cells (CL Brener strain), irradiated with 500 Gy (diamonds) or not (squares), were determined every 48 h. (B) PFGE gel stained with ethidium bromide of *T. cruzi* chromosomes after exposure to 500 Gy of ionizing radiation. N.I. indicates non-irradiated CL Brener DNA.

4. Discussion

DNA recombination machineries are present in all organisms tested, from bacteria to humans. In *T. brucei*, it has been demonstrated that recombination plays an important function in generating the antigenic variability that is crucial for evasion of the host immune system [9]. In *T. cruzi*, the recombination machinery may be responsible for the low heterozygosity observed in the genome of most *T. cruzi* strains [5], a feature not expected to be found in asexual organisms [20]. The 371-amino acid sequence deduced from the *T. cruzi Rad51* gene has a high similarity to RAD51 proteins in human, yeast, *L. major* and *T. brucei*. All of the conserved domains found in previously characterized RAD51 proteins, such as the helix–hairpin–helix motif, the ATP binding motif (Walker type A) and the motif of the AAA ATPase family, predicted to interact with DNA [21,22] and to mediate ATP binding and hydrolysis, respectively [23], were identified. A 8-amino acid conserved motif characteris-

	Relative RNA levels measured by real-time RT-PCR
wild type cells	1.00
Rad51 transfected cells	1.94 ± 0.74

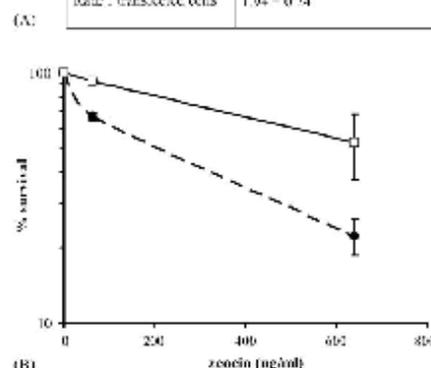


Fig. 6. Growth curves of *T. cruzi* over-expressing the *TcRad51* gene after exposure to zeocin. (A) The table shows mRNA quantification obtained by real-time RT-PCR analysis using primers specific for the *TcRad51* gene. (B) Survival of *T. cruzi* CL Brener wild-type cells (circles) and CL Brener over-expressing RAD51 gene (squares) following treatment with zeocin. Epimastigote cultures were exposed for different doses of zeocin and after 4 days parasite survival was determined by counting viable cells.

tic of recombinase active sites is also present in the C-terminal region [9].

T. cruzi isolates are not typically a homogeneous population, but rather are composed of a pool of strains [24]. A role for TcRAD51 in rare events of genetic exchange that may occur within a *T. cruzi* population was indicated by the expression pattern observed for *TcRad51* during the *T. cruzi* life cycle. In agreement with recent reports using transgenic parental strains that unequivocally demonstrated genetic exchange can occur during the intracellular stage of the parasite [2], we observed higher levels of *TcRad51* mRNA in amastigotes compared to epimastigote and trypomastigote cultures. By transfecting mammalian cells with *TcRad51* we also showed that the expression of *TcRad51* leads to an increased recombination rate. These results indicate the *TcRad51* gene is translated into a functional protein that is able to promote recombination in eukaryotic cells. Therefore, it can be assumed that the *T. cruzi* protein can bind cooperatively to DNA to form helical nucleoprotein filaments and mediate pairing and strand exchange between homologous DNA molecules.

One of the most striking pieces of evidence for the importance of DNA recombination in *T. cruzi* is its high resistance to ionizing radiation. Early attempts to develop protocols for parasite attenuation [25] indicated that most *T. cruzi* strains display an unusually high resistance to ionizing radiation. *T. cruzi* epimastigotes tolerate irradiation doses similarly to yeast cells [26], which are 10 times greater than the LD₃₇ determined for *E. coli* (88 Gy) [27] and approximately 50–100 times the LD₅₀ deter-

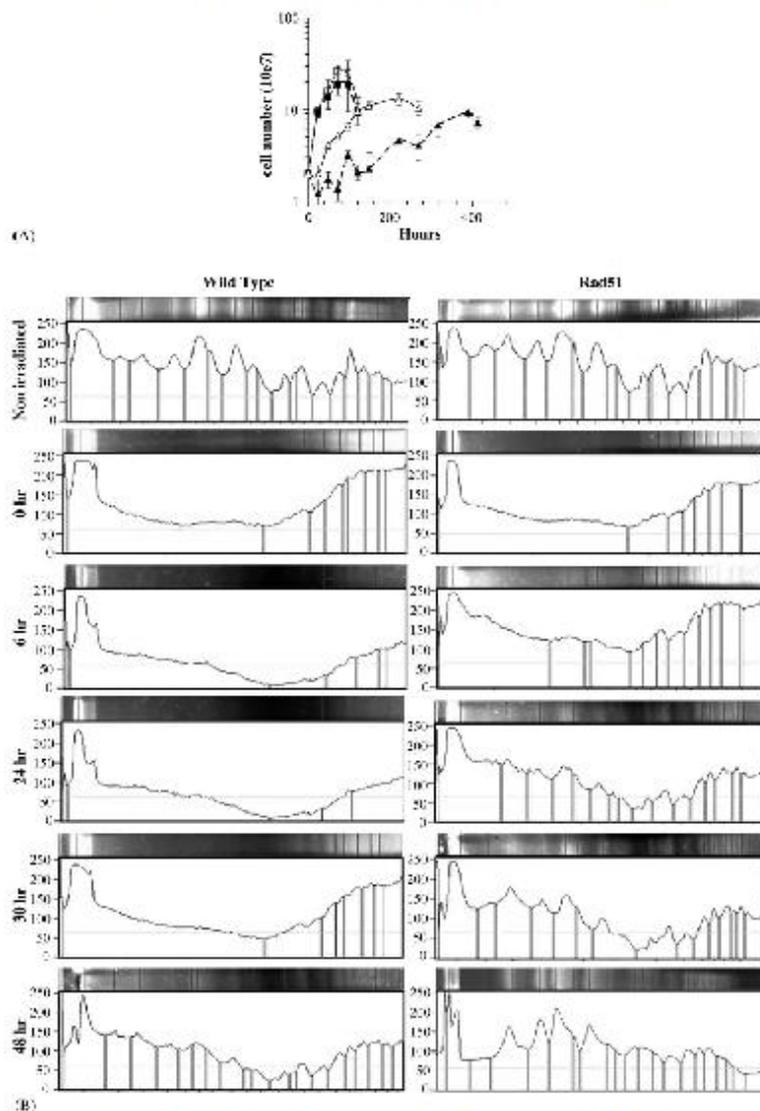


Fig. 7. *T. cruzi* response to ionizing radiation. (A) Number of transfected *T. cruzi* and wild-type epimastigote cells (CL Brener strain) were determined for up to 412 h after exposure to 0 and 500 Gy of ionizing radiation. Parasites over-expressing the *TcRAD51* gene were irradiated with 0 Gy (open squares) or 500 Gy (open triangles). Wild-type cells were irradiated with 0 Gy (closed squares) or 500 Gy (closed triangles). The experiments were made in three replicates. (B) PFGE gel stained with ethidium bromide of *T. cruzi* (over-expressing or not the *RAD51* gene) chromosomes after exposure to 500 Gy of ionizing radiation. For each time is showed the densitometry analysis of stained bands.

mined for plant roots [28], *Plasmodium* [29] and mammalian cells [30,31]. Although not as tolerant to gamma irradiation as the bacterium *Deinococcus radiodurans*, which shows no loss of viability when exposed to radiation doses of 5 kGy [32], the

data shown here indicates that *T. cruzi* is one of the most resistant eukaryotic cell described.

Three independent results substantiated our assumption that the recombination machinery may be responsible for the para-

site resistance to gamma irradiation: (i) DNA fragmentation is repaired after gamma irradiation with a faster recovery kinetics in cells over-expressing TcRad51; (ii) expression of the *TcRad51* mRNA is induced in response to irradiation; (iii) over-expression of TcRAD51 leads to a high survival of *T. cruzi* cultures in the presence of zeocin, a drug that mimics the action of ionizing radiation. In addition, recent data from the *T. cruzi* genome project indicated that some genes involved in the non-homologous end joining DNA repair pathway are absent in the *T. cruzi* genome [6], suggesting that all DSB repair in this protozoan might be achieved through recombination repair.

Similar to *T. brucei*, *T. cruzi* presents five paralogues (RAD51-3, RAD51-4, RAD51-5, RAD51-6, DMC1) [33], in addition to the orthologue of RecA gene described here. In various organisms the presence of different paralogues of RecA protein has been identified. In *Saccharomyces cerevisiae*, four RecA-like homologues (RAD51, RAD55, RAD57 and DMC1) have been identified. Heterodimeric complex of Rad55 and Rad57 proteins promotes DNA strand exchange by Rad51 with replication protein A. DMC1 is a meiosis-specific gene [33]. In mammals, seven RecA-like genes (RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3 and DMC1) have been identified. While the RAD51 plays a central role in homologous recombination, the other genes are referred to as parologs of RAD51, meaning that they are presumably derived from a common ancestral gene and have acquired more specialized roles than those of prokaryotes and lower eukaryotes [34].

The kinetics of growth by *T. cruzi* cells after the irradiation is quite similar to the growth effect observed in the radiation-resistant bacterium *D. radiodurans*. In this bacterium cell growth is blocked after ionizing radiation exposure while DNA is repaired and then after 9–24 h, cell growth starts again [32]. So in these two organisms, the cells do not return the growth immediately after the DNA repair, indicating other process is also involved. In *T. brucei*, the *Rad51* gene was shown to be involved in the recombination process leading to transcription of a new VSG gene in the active VSG gene expression site [9]. Interestingly, the *T. cruzi* genome presents large gene families such as trans-sialidases, mucins and MASP that might be involved with immune evasion [6]. These families are present as tandem repeats which permit the more accessibility to the recombination machinery that is responsible for gene conversion events. In a predominantly asexual organism, gene conversion must play an essential role preventing the accumulation of a large number of pseudogenes that may arise due to the normal mutation rate. We are presently addressing this issue by analyzing the number of pseudogenes in multi-copy gene families organized in tandem arrays versus gene families with their members dispersed throughout the genome. Thus, in addition to its role in DSB repair and resistance to ionizing radiation, other functions of the recombination machinery of *T. cruzi* that may be essential for its survival are now beginning to be addressed.

Acknowledgments

Supported by CNPq-Brazil, PRONEX and CAPES-COFECUB. The research from S.M.R. Teixeira and C.R.

Machado was supported, in part, by an International Research Scholars Grant from the Howard Hughes Medical Institute. We are grateful to Kátia Barroso Gonçalves and Neuza Antunes Rodrigues for technical support.

References

- [1] Laurent JP, Barnabe C, Quesney V, Noel S, Tihayrenc M. Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. Parasitology 1997;114:213–8.
- [2] Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. Nature 2003;421:936–9.
- [3] Welch DM, Meselson M. Evidence for the evolution of *Bdelloid rotifers* without sexual reproduction or genetic exchange. Science 2000;288:1211–5.
- [4] Oliveira RP, Melo AI, Macedo AM, Chiari E, Pena SD. The population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94:65–70.
- [5] Machado CA, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:7396–401.
- [6] El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. Science 2005;309(5733):409–15.
- [7] Kanaar R, Hoelijmakers JH, van Gent DC. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. Trends Cell Biol 1998;8:483–8.
- [8] Bhattacharyya MK, Norris DE, Kumar N. Molecular players of homologous recombination in protozoan parasites: implications for generating antigenic variation. Infect Genet Evol 2004;4(2):91–8.
- [9] McCulloch R, Barry JD. A role for RAD51 and homologous recombination in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. Genes Dev 1999;13(21):2875–88.
- [10] McKean PG, Keen JK, Smith DF, Benson FE. Identification and characterization of a RAD51 gene from *Leishmania major*. Mol Biochem Parasitol 2001;115(2):209–16.
- [11] Teixeira SM, Russell DG, Kirchhoff LV, Doneelson JE. A differentially expressed gene family encoding “amastin”, a surface protein for *Trypanosoma cruzi* amastigotes. J Biol Chem 1994;269(32):20509–16.
- [12] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman D. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990;215:403–10.
- [13] Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucl Acids Res 1988;16:10881–90.
- [14] Ingham DJ, Beer S, Money S, Hansen G. Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. Biotechniques 2001;31:132–40.
- [15] Engman DM, Reddy LV, Doneelson JE, Kirchhoff LV. Mol Biochem Parasitol 1987;22(2–3):115–23.
- [16] Cano MI, Gruber A, Vazquez M, et al. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. Mol Biochem Parasitol 1995;71:273–8.
- [17] DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, et al. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. Parasitol Res 2004;92(2):113–20.
- [18] Liang F, Han M, Romanienko P, Jasin M. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:5172–7.
- [19] Berdy J. Bleomycin-type antibiotics. In: Berly J, editor. Amino acid and Peptide antibiotics. CRC Press; 1980. p. 459–97.
- [20] Schon I, Martens K. No slave to sex. Proc R Soc Lond B: Biol Sci 2003;270:827–33.
- [21] Thayer MM, Ahern H, Xing D, Cunningham RP, Tainer JA. Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. EMBO J 1995;14:4108–20.
- [22] Aravind L, Walker DR, Koonin EV. Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. Nucl Acids Res 1999;27:1223–42.

- [23] Iyer LM, Leippe DD, Koonin EV, Aravind L. Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J Struct Biol* 2004;146:11–31.
- [24] Machado CR, Augusto-Pinto L, McCulloch R, Teixeira SM. DNA metabolism and genetic diversity in trypanosomes. *Mutat Res* 2006;612:40–57.
- [25] Takeda GK, Campos R, Kieffer J, et al. Effect of gamma rays on blood forms of *Trypanosoma cruzi*. Experimental study in mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1986;28:15–8.
- [26] Bennett CB, Lewis LK, Karthikeyan G, et al. Genes required for ionizing radiation resistance in yeast. *Nat Genet* 2001;29(4):426–34.
- [27] Quint RM, Solar S, Stan-Lotter H. Radiation sensitivity of *N. pharaonis* in comparison with *E. coli* K12 strains. *Radiat Environ Biophys* 2002;41(2):145–8.
- [28] Jiang CZ, Yen CN, Cronin K, Mitchell D, Britt AB. UV- and gamma-radiation sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 1997;147(3):1401–9.
- [29] Geoghegan DS, Skinner-Adams T, Davis TM. *Plasmodium falciparum*: isolate-specific radiosensitivity. *Exp Parasitol* 2001;99(2):108–10.
- [30] Yonetani Y, Hochegger H, Sonoda E, et al. Differential and collaborative actions of Rad51 paralog proteins in cellular response to DNA damage. *Nucl Acids Res* 2005;33(14):4544–52.
- [31] Takata M, Sasaki MS, Tachiiri S, et al. Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol* 2001;21(8):2858–66.
- [32] Liu Y, Zhou J, Omelchenko MV, et al. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(7):4191–6.
- [33] Proudfoot C, McCulloch R. Distinct roles for two RAD51-related genes in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Nucl Acids Res* 2005;33(21):6906–19.
- [34] Kawabata M, Kawabata T, Nishibori M. Role of recA/RAD51 family proteins in mammals. *Acta Med Okayama* 2005;59(1):1–9.



Review

***Escherichia coli* as a model system to study DNA repair genes of eukaryotic organisms**

Luiz Augusto-Pinto, Carlos Gustavo Regis da Silva,
Débora de Oliveira Lopes, Alice Machado-Silva and
Carlos Renato Machado

Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de
Minas Gerais, 30161-970 Belo Horizonte, MG, Brasil
Corresponding author: C.R. Machado
E-mail: crmachad@mono.icb.ufmg.br

Genet. Mol. Res. 2 (1): 77-91 (2003)
Received November 27, 2002
Published March 31, 2003

ABSTRACT. The bacteria *Escherichia coli* has been widely employed in studies of eukaryotic DNA repair genes. Several eukaryotic genes have been cloned by functional complementation of mutant lineages of *E. coli*. We examined the similarities and differences among bacterial and eukaryotic DNA repair systems. Based on these data, we examined tools used for gene cloning and functional studies of DNA repair in eukaryotes, using this bacterial system as a model.

Key words: DNA repair, Functional complementation, *Escherichia coli*

INTRODUCTION

The bacterial genome encodes approximately 115 proteins involved in at least one aspect of DNA repair (Aravind et al., 1999). This metabolic scenario has been maintained throughout evolution, since all eukaryotic organisms, as well as bacteria, must safeguard against DNA damage, which would be incompatible with life if DNA repair machinery did not make the necessary corrections. When we analyze bacterial and eukaryotic DNA repair systems, we can see that there is a great deal of similarity in the ways these groups of organisms remove damage from DNA. The genome of both kinds of organisms is subjected to the same chemical reactions, which generate the same damaged substrates for the proteins involved with DNA repair. It is therefore expected that the biochemical pathways employed by eukaryotic cells to respond to such damage would be similar to the bacterial ones. For instance, the loss of purines and pyrimidines from DNA produces apurinic or apyrimidinic (AP) sites that are repaired after the action of AP endonucleases, which catalyze the incision of DNA exclusively at AP sites, thereby preparing DNA for subsequent excision, repair synthesis, and strand sealing. This pathway is the same in bacterial and eukaryotic organisms and, furthermore, there is considerable conservation of amino acids among the AP endonucleases of these two types of organisms; this degree of conservation can be as high as 41% (Popoff et al., 1990). However, there are also differences in the DNA repair systems of bacteria and eukaryotes. In the latter the metabolic scenarios are more complex, since some proteins have multiple functions in cell cycle checkpoints, chromatin assembly, DNA repair and DNA replication. In comparison, a pathway that in bacteria involves only five major proteins is constituted of at least 15 other proteins in eukaryotes, as observed in the nucleotide excision repair pathway (Cleaver et al., 2001).

In this review, we describe the use of bacteria as a tool for cloning and for functional studies of eukaryote DNA repair genes.

THE MAJOR PATHWAYS OF DNA REPAIR

All proteins, from bacterial to human, involved in DNA repair can be grouped into the following major functional categories: a) damage reversal, b) base excision repair (BER), c) nucleotide excision repair (NER), and d) mismatch repair (MMR). We describe the fundamental and most recently discovered molecular aspects of each pathway, using the bacterial system as a model for DNA repair in eukaryotic studies, which are considered later in this review.

DAMAGE REVERSAL

The direct reversal of DNA damage is by far the simplest repair mechanism described until now. It consists of a single-polypeptide chain, with enzymatic properties, binding to the damage and restoring the DNA genome to its normal state in a single-reaction step. The major polypeptides involved in this pathway are: a) DNA photolyase, which is the enzyme responsible for removing cyclobutane pyrimidine dimers from DNA in a light-dependent process denominated photoreactivation (Carell et al., 2001), and b) O6-methylguanine-DNA methyltransferase I and II, also called DNA-alkyltransferases, which remove the modified bases O6-alkylguanine and O4-alkylthymine and the backbone-modified phosphate alkylphosphotriesters (methylphosphotriesters) (Pegg, 2000) from DNA. The photolyase protein is not found in all

living cells. Most studies have consistently failed to provide biological or biochemical evidence of photoactivation in primates. However, the DNA-alkyltransferases are widespread in nature. Activity of this group of enzymes has been identified in extracts of *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, fish and in mammalian cells (Friedberg et al., 1995).

EXCISION OF DNA DAMAGE

There are three major pathways of DNA excision repair: i) BER, ii)NER and iii) MMR. In these reactions a nucleotide segment containing base damage, double-helix distortion or mispaired bases is replaced by the normal nucleotide sequence in a new DNA polymerase synthesis process. All of these pathways have been characterized in both bacterial and eukaryotic organisms.

Base excision repair

BER is initiated by DNA glycosylases, which catalyze the hydrolysis of the N-glycosylic bonds, linking particular types of chemically altered bases to the desoxyribose-phosphate backbone. Thus, DNA damage is excised as free bases, generating sites of base loss called apurinic or apyrimidinic (AP) sites. Another means of AP site generation is the depurination or depyrimidation of DNA, due to spontaneous hydrolysis of N-glycosylic bonds. The AP sites are substrates for AP endonucleases. These enzymes produce incisions in duplex DNA as a result of the hydrolysis of a phosphodiester bond immediately 5' or 3' to each AP site. The ribose-phosphate backbone is then removed from the DNA through the action of a specific exonuclease called deoxyribosephosphodiesterase or dRPase. Finally, the DNA polymerase and a ligase catalyze the incorporation of a specific deoxyribonucleotide into the repaired site, enabling correct base pairing (Figure 1) (Friedberg et al., 1995).

Base excision repair is a multiple enzymatic DNA repair mechanism in which each enzyme works separately; this scenario has been maintained during evolution. Known from bacteria, several DNA glycosylases and AP endonucleases have also been described in lower and higher eukaryotes, such as *Trypanosoma cruzi* (Perez et al., 1999), *Leishmania major* (Perez et al., 1999), yeast, fish, plants, *C. elegans*, *Drosophila* and mammals (Friedberg et al., 1995). BER is essential to protect DNA from various types of lesions, such as: uracil, hydroxymethyluracil, methylcytosine, hypoxanthine, G-T mispairs, 3-methyladenine, 7-methylguanine, 3-methylguanine, formamidopyrimidine, 8-hydroxyguanine, 5,6-hydrated thymine, and pyrimidine dimers (Friedberg et al., 1995). Each of these is recognized by a specific DNA glycosylase.

Nucleotide excision repair

Several types of agents generate bulky base adducts in DNA, leading to a significant distortion of the DNA helix. The most widely studied of these DNA damaging agents is UV radiation, responsible for thymine dimers, which produce a bend of ~30° in the DNA (Husain et al., 1988). Some chemical agents form DNA cross-links, which are particularly hazardous. These cross-links produce conformational distortions in DNA; they are substrates for DNA endonucleases that make an incision in DNA, several nucleotides to each side of the damage,

L. Augusto-Pinto et al.

80

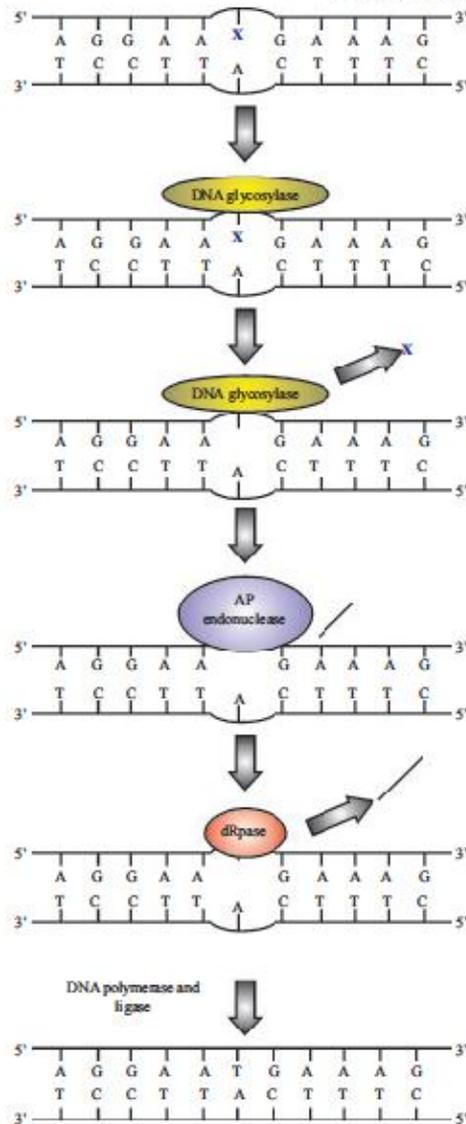


Figure 1. Schematic representation of base excision repair. Base damage (represented as X) is recognized and removed by specific DNA glycosylases (in yellow), generating an AP site. AP endonuclease (shown in blue) then hydrolyses the phosphodiester bond immediately 5' or 3' to each AP site and the one-phosphate backbone is removed from DNA through the action of dRpase (in red). Finally, the resulting single nucleotide gap is filled by the action of DNA polymerase, and a ligase seals the repaired strand. dRpase = deoxyribosephosphodiesterase.

generating a potential oligonucleotide fragment. Subsequent helicase reactions promote the excision of this fragment. The resulting gap is filled by DNA polymerase synthesis and covalently sealed by DNA ligase. These sequential enzymatic reactions, initiated by a specific endonuclease that recognizes the DNA distortion, are called NER. This pathway was originally described in the repair of DNA in cells exposed to UV radiation, which produces lesions such as pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts that are enzymatically excised from DNA as intact nucleotides rather than as free bases. NER is a much more complex biochemical process than BER, especially in eukaryotic cells. Several gene products are required in a multiple step process, during which the ordered assembly of DNA proteins provides an enzymatic complex that discriminates damaged from undamaged DNA.

In *Escherichia coli* there are three specific proteins, called UvrA, B and C, involved in lesion recognition and endonuclease incision. An assembly of two UvrA and one UvrB protein binds to DNA nonspecifically; this assembly translocates unidirectionally in the genome, driven by the energy of ATP hydrolysis (Grossman and Yeung, 1990). This mechanism allows constant monitoring for base damage in living cells. It has been suggested that when a damaged site is found, UvrA proteins dissociate and a stable UvrB-DNA complex is formed (Grossman and Yeung, 1990). Then the UvrC protein associates with high affinity to the UvrB-DNA site and induces a conformational change that enables bound UvrB protein to nick the DNA at the fourth nucleotide, 3' to the site of damage (Grossman and Yeung, 1990). This reaction requires the binding of ATP by UvrB protein, however, no ATP hydrolysis occurs at this time (Grossman and Yeung, 1990). Following the 3' incision, UvrC protein catalyzes nicking of the DNA at the seventh nucleotide, 5' to the damage (Grossman and Yeung, 1990). Thus, a stretch of 12 nucleotides is held in the DNA by only hydrogen bonds. This fragment is released by UvrD helicase action, generating a gap that is finally submitted to repair synthesis (Figure 2) (Grossman and Yeung, 1990).

Mismatch repair

The long patch MMR machinery is present in several organisms. Its function is to remove base substitution and frameshift mismatches that escape from DNA polymerase proof-reading activity after DNA replication, increasing DNA replication fidelity 100- to 1000-fold (Modrich and Lahue, 1986). In *E. coli*, the factors that are exclusively involved in MMR are encoded by *mutS*, *mutL* and *mutH* genes (Lahue et al., 1989).

The MutS protein homodimers recognize and bind specifically to base-base mispairing and insertion/deletion loop-outs (IDL). Then, MutS, in association with MutL protein homodimers, activates the MutH protein to make an excision-initiating nick in the unmethylated, newly synthesized strand. The nicked strand containing the mismatch or IDL is excised by exonucleases and resynthesized by DNA polymerase and DNA ligase (Figure 3) (Marra and Schär, 1999).

The current picture of MMR in eukaryotic cells resembles that of *E. coli* to a great extent, but with two important differences. The first is related to strand discrimination. In eukaryotes the hemimethylation status of newly replicated DNA does not play a role in directing the MMR. No MutH homologue has been identified and it has been proposed that strand discrimination is mediated by strand discontinuities in the newly synthesized DNA. The second fundamental difference is that the MutS and MutL functional homologues are heterodimeric

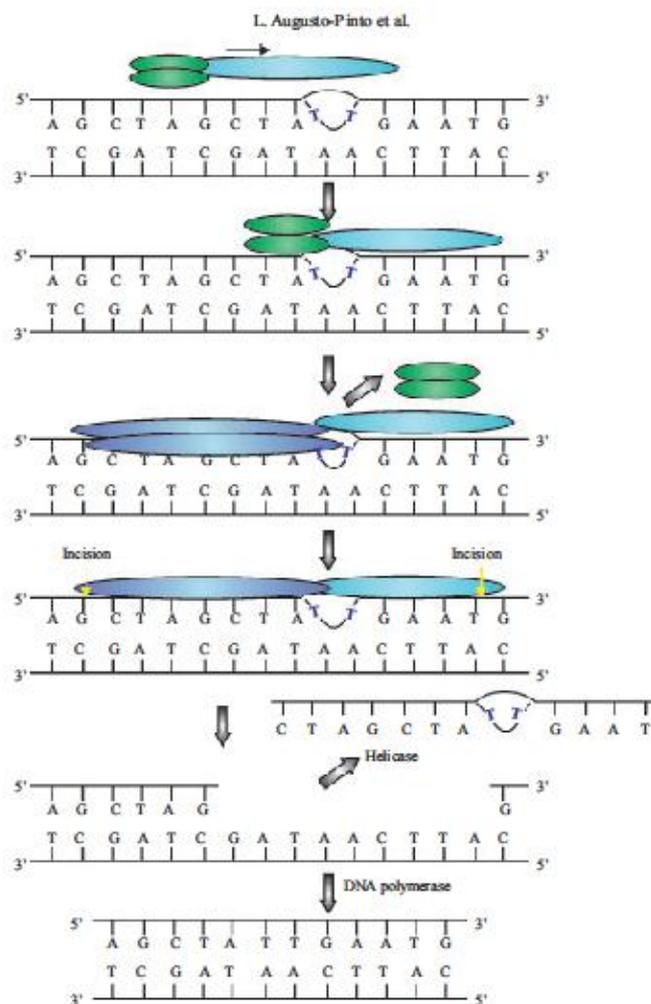


Figure 2. Schematic representation of nucleotide excision repair. The UvrAB heterodimer scans the DNA searching for large distortions in the helix such as the ones caused by pyrimidine dimers. Once a damaged site is found, UvrA proteins (dark green) dissociate, and a stable UvrB-DNA (light green) complex is formed. UvrC (blue) associates to bound UvrB and enables UvrB protein to nick the DNA at the fourth nucleotide 3' to the site of damage. Following the 3' incision, UvrC protein catalyzes nicking of the DNA at the seventh nucleotide, 5' to the damage. The potential oligonucleotide fragment that is generated is removed by a helicase. The remaining gap is filled up by polymerase synthesis and repair is completed by ligase.

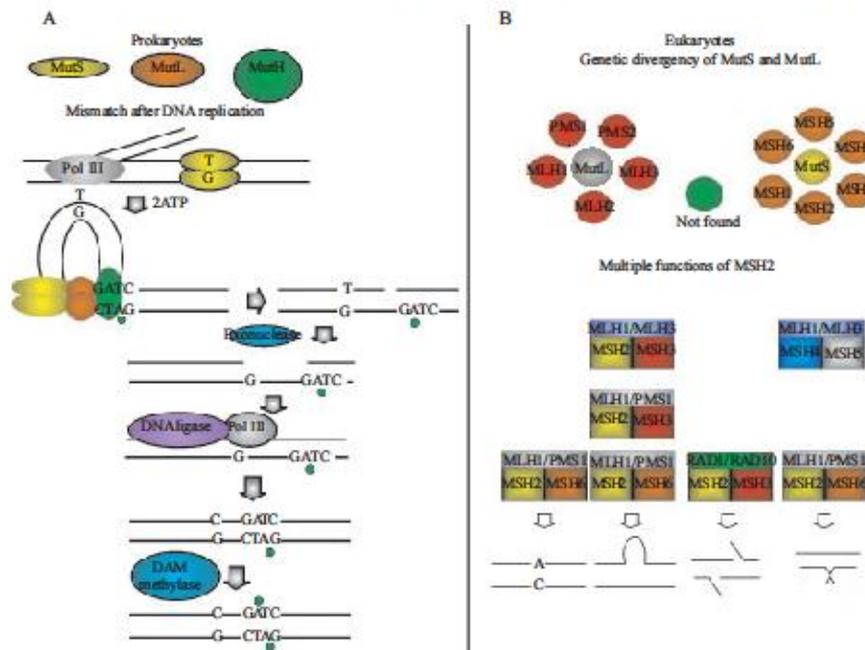


Figure 3. A, Schematic representation of mismatch repair in prokaryotes. The MutS homodimer protein binds to the DNA mismatch and makes a loop in DNA using the energy of hydrolysis of two ATP molecules. The MutL homodimer protein then associates with the bottom of this loop and activates the endonuclease MutH. The MutH protein only nicks the unmethylated strand, which contains the incorrect base. Afterwards, the cleaved strand is submitted to exonuclease activity, DNA resynthesis and ligation. B, Schematic representation of the eukaryotic mismatch repair system. The MutS proteins diverged into six orthologous genes, while MutL diverged into five other genes; these are denominated MSH and MLH, respectively. The MutH protein is not found in eukaryotes. The MSH and MLH proteins interact as a functional heterocomplex and repair several types of substrates, such as mismatches, single-strand loops generated during microsatellite replication, DNA double-strand breaks, and holiday junctions from meiotic crossing-over.

rather than homodimeric. At least six MutS homologues and five MutL homologues, referred to as MSH and MLH, respectively, have been identified in eukaryotes. The best characterized of these factors are MSH2, MSH3 and MSH6, which are involved in MMR in the nucleus. MSH2-MSH6 heterodimers recognize and repair base mismatches and loops of up to two bases, whereas MSH2-MSH3 heterodimers recognize loop-outs of different sizes (Drumond et al., 1995; Marsischky et al., 1996). MSH4 and MSH5 proteins constitute another MSH heterodimer, which, however, does not participate in MMR, but instead is involved in meiotic crossing-over and chromosome segregation (Figure 3) (Nakagawa et al., 1999). MSH1 is targeted to the mitochondria and is necessary for mitochondrial stability in yeast (Reenan and Kolodner, 1992).

CLONING AND CHARACTERIZATION OF EUKARYOTIC DNA REPAIR GENES USING *ESCHERICHIA COLI*

Complementation with homologous genes

In 1985, Sancar described the use of *E. coli* as an instrument to study eukaryotic DNA repair genes. A fragment carrying the photolyase gene (PHR1) of *Saccharomyces cerevisiae* was cloned into an *E. coli* expression vector and introduced into *E. coli* strains deficient in DNA photolyase. Complementation of the *E. coli* *phr-1* mutation was observed. This was the first time that a complementation approach was used to study eukaryotic DNA repair genes in *E. coli*.

After this, several other eukaryotic genes were identified and characterized by complementation assays in bacteria deficient in DNA repair. They were isolated from *E. coli* mutant cells transformed with a cDNA expression library, due to their ability to restore, at least partially, the resistance of the mutants to treatment with DNA damaging agents (Figure 4).

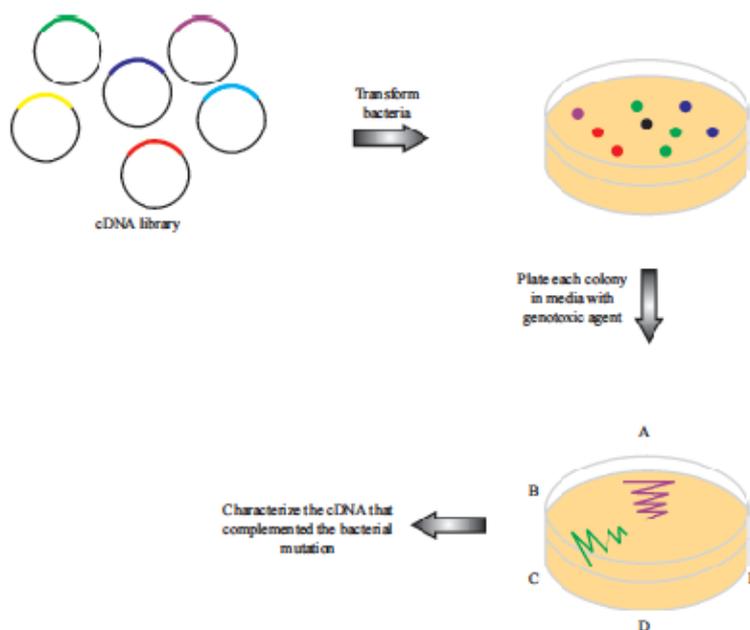


Figure 4. Schematic representation of a functional complementation assay. A cDNA library is used to transform bacteria deficient in DNA repair. The colonies are plated in a selective media containing a genotoxic agent. Clones are thus selected by their ability to restore, at least partially, the resistance of the mutants to treatment with DNA damaging agents. The cDNAs that complemented the bacterial mutation are then characterized.

Chen et al. (1989) used this system to clone an *S. cerevisiae* gene. They used *E. coli* strains MV1932 (*alkA1* and *tag*) and MV1902 (*alkA150::λpSG1* and *tag*), which have mutant *alkA* and *tag* genes. These bacterial cells are sensitive to DNA damage by methylating agents, such as methyl methanesulfonate (MMS), due to the absence of either the *AlkA* or the *Tag* gene product, respectively. The 3-methyladenine DNA glycosylase (*MAG*) from *S. cerevisiae* (*ScMAG*) was cloned from a genomic library, as it complemented the bacterial gene function, restoring the ability of the bacteria to survive in the presence of MMS. An additional enzymatic assay showed that extracts from deficient bacteria harboring the cloned yeast gene were able to excise modified bases from [³H]-DMS-treated calf thymus DNA. Chromatographic procedures demonstrated that the excised base was 3-methyladenine. Sequence analyses established the identity of this gene as *ScMAG* and its expression in yeast-protected cells against the lethal effects of alkylating agents (Chen et al., 1990). This bacterial complementation strategy has also allowed the cloning of other *MAG* genes. Human *MAG* (*hMAG*) was isolated from a human liver cDNA library (Samson et al., 1991). Its cDNA sequence has an open-reading frame of 894 base pairs and a sequence of 176 amino acids, sharing 85% identity with a rat glycosylase polypeptide. Enzymatic analyses showed the ability of three variants of the hMAG protein to release methylated bases from DNA (O'Connor, 1993). HPLC chromatography identified the modified bases as 3-methyladenine, 7-methylguanine and 3-methylguanine. *Arabidopsis thaliana*, *Schizosaccharomyces pombe* and rat *MAGs* have also been cloned and characterized using this bacterial system (O'Connor and Laval, 1990; Santerre and Britt, 1994; Memisoglu and Samson, 1996). In addition to *MAG* genes, an *S. cerevisiae* alkyl DNA glycosylase has also been cloned from a genomic DNA library, using an *E. coli* strain with a phenotype similar to the *alkA tag* double mutant (Berdal et al., 1990).

Genetic manipulation of *E. coli* to create mutator phenotype strains could also be used to clone DNA repair genes. Hydroxyl radical (OH[•]) and singlet oxygen (¹O₂), produced endogenously by oxidative stress can generate complex modifications in DNA bases (Boiteux et al., 1992). One of these is the oxidized guanine, 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-OxoG), which can pair up with adenine instead of cytosine, causing a GC → TA transition. The 8-OxoG residues can be removed from DNA by the action of FPG protein and the adenine residue opposite 8-OxoG can be excised by MutY protein. Hence, disruption of *fpg* and *mutY* genes could be used to create a mutator phenotype strain in order to select for DNA repair genes involved in 8-OxoG excision. The *S. cerevisiae* *OGG1* gene (*ScOGG1*) was cloned this way (van der Kemp et al., 1996). A *fpg mutY*-double mutant *E. coli* strain was transformed with a yeast genomic DNA library and clones that partially suppressed the bacterial mutator phenotype were selected. The loss of the ability to generate mutants was visualized by the reduction in the number of colonies resistant to the antibiotic rifampicin. ScOGG1 protein purified from over expression in *E. coli* was used to confirm the enzymatic nature of this gene product in experiments with 8-OxoG excision from calf thymus DNA. Mouse and human homologues involved in 8-OxoG excision have also proven their ability to promote the loss of a mutator phenotype in a rifampicin-resistance assay, providing additional information for the characterization of OGG1 (Rosenquist et al., 1997; Aburatani et al., 1997; Arai et al., 1997; Sugimura et al., 1999). Kohno et al. (1998) have also used this bacterial complementation assay to study differences in 8-OxoG repair caused by human polymorphic *OGG1* genes. The gene product with a Ser at codon 326 had an increased efficiency of complementation compared to its Cys counterpart.

An interesting approach to study eukaryotic DNA repair genes is the employment of *E. coli* mutator or sensitive phenotype reversion in order to select and characterize mutant genes. Christians and Loeb (1996) have used a $\Delta ada-25$ *Cm^r ogt-1::Kan^r* *E. coli* strain to search for mutations in human O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (*hsMGMT*) that could maintain the complementation phenotype in the deficient bacterial strain. This bacterial strain, which lacks the *ada* and *ogt* gene products, is sensitive to alkylating agents such as *N*-methyl-*N*²-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) and to the chemotherapeutic nitrosoureas. A plasmid library harboring the human MGMT gene, randomly mutated in a region surrounding the Cys active residue, was used to transform these deficient bacteria. Clones were selected by their ability to grow in the presence of MNNG and also to reverse the mutator phenotype. As the chosen region is evolutionary conserved, few amino acid changes were found. Using this strategy of mutant identification in an *ada ogt* deficient bacterial strain, Xu-Welliver et al. (1999) tested for *hsMGMT* mutation at codon 160, which rendered the bacteria resistant to O⁶-benzylguanine (BG). A cDNA from this gene was randomly mutated at this position and used to transform bacterial strains lacking alkyltransferase activity. As it is an inhibitor of human MGMT protein (Dolan et al., 1990; Dolan and Pegg, 1997), this drug has been used in clinical trials to improve the efficiency of alkylating drugs such as BCNU and temozolomide (Friedman et al., 1998). Polymorphic G160R *hsMGMT* has been found in some individuals (Imai et al., 1995), and this polymorphism has been associated with BG resistance (Edara et al., 1996). Fourteen amino acid substitutions at codon 160 have been related to BG resistance (Xu-Welliver et al., 1999), all of them protecting the *E. coli* mutant strain against MNNG damage. Enzymatic analysis of bacterial extracts or purified protein have proven the effectiveness of these mutant proteins in repairing O⁶-[³H]-methylguanine, although with a lower activity than wild type extracts.

Bacterial complementation by eukaryotic genes could be used to study genetic polymorphisms or mutants, as has been shown for the *hsMGMT* gene. Another example of successful exploration of this approach involves DNA polymerase β (*pol* β) gene studies. Sweasy and Loeb (1992) showed the ability of rat *pol* β to complement the activity of DNA pol I from an *E. coli* strain, which has a mutation in the DNA pol I gene (*polA12*) that makes bacterial cells unable to grow at high temperatures. This complementation system has opened new perspectives to identify mutations in the rat *pol* β sequence that impair polymerase function. Rat *pol* β cDNA has been used to construct a library of *pol* β cDNA mutants by treatment with nitrous acid, PCR amplification and bacterial cloning (Sweasy and Loeb, 1993). Sensitive bacteria were transformed with the mutant cDNA library and clones with partial or total loss of polymerase activity were selected. A total of 1186 bacterial transformants were tested for their ability to grow in the presence of MMS at 42°C. Polymerase function was altered in 263 clones. Sequence analysis of 10 clones confirmed single-base substitutions. Fifty-six mutants were unable to grow in both conditions and the others only lost the ability to grow at 42°C. This work has demonstrated the possibility of employment of this *polA12* strain in mutant selection. Further mutant characterization was carried out to identify the low fidelity polymerase mutants that conferred the enzymatic mutator phenotype (Washington et al., 1997). Two methods were used to create the mutant library: the first one was nitrous acid treatment, followed by PCR amplification and bacterial cloning, and the other one was PCR under mutagenic conditions. After selection for ability to complement the *polA12* strain, positive clones were tested for promotion of *trp* mutation reversion, which could be associated with the mutator phenotype. Three rat *pol* β mutants were identified and characterized. One of them had a Y265C substitu-

tion and a mutation rate 30-fold higher than the wild type. This mutator enzymatic activity was detected by an *in vitro* activity assay. The other two had a P312S and a Y265H substitution, respectively, and the mutation rates were increased 10-fold in comparison to wild type. The mutation in the three clones that were analyzed is located in the protein's carboxyl terminus at an external position on the DNA-binding cleft. Similar to hMGMT, it was also possible to identify drug-resistant mutants of the rat *pol β* gene (Kosa and Sweasy, 1999). A cDNA library was generated in a mutagenic PCR condition that guaranteed mostly single-base changes and was used to transform a *polA12 E. coli* strain. The transformed bacteria were then challenged for growth in the presence of 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) at 42°C. The rat *pol β* is able to incorporate AZT into DNA during synthesis, causing cell death. The clones able to grow in the presence of AZT at 42°C kept their enzymatic activity, but they lost the ability to incorporate AZT. Two mutants were selected, D246V and R253M; they gave a more effective discrimination against AZT than the wild type protein. The D246V mutant had a 10-fold decrease in the catalytic efficiency of AZT incorporation but dTTP incorporation was unaffected. On the other hand, the R253M mutants showed a moderate efficiency in AZT incorporation, combined with a perturbation in dTTP incorporation. These amino acid substitutions are close to the nucleotide-binding pocket and could affect nucleotide discrimination and selection.

All the examples above are from damage reversal or base excision repair. This is due to the fact that the proteins involved in these pathways can work separately and do not need to interact with other proteins to accomplish their function. The study of genes involved in NER and MMR is more difficult. A good example is the study of the MSH2 gene, the eukaryotic homologue of the *E. coli* MMR gene MutS. It has been shown that the expression in *E. coli* of a eukaryotic protein related to the MutS family results in an increased mutation rate in the bacteria, due to lack of interaction of the heterologous protein with the normal bacterial repair machinery (Augusto-Pinto et al., 2001).

Complementation with non-homologous genes

Besides phenotype complementation with homologous genes, the use of DNA-repair-deficient *E. coli* strains to select for genes involved in this DNA metabolism pathway have provided a means for the selection and characterization of new genes that are involved in DNA repair but are not homologous with known DNA repair proteins.

Pang et al. (1992, 1993) employed this technique to obtain clones that complement *E. coli* strain *recA⁻, uvr⁻, phr⁻* (genes related to DNA repair). One of the isolated cDNAs partially complements recombination related (*RecA⁻*) phenotypes. Another three cDNAs also partially corrected the *E. coli* mutant phenotypes, but their molecular roles were not clearly identified. Most of these cDNAs are apparently targeted to chloroplasts.

Among 840 survivors of heavily UV-irradiated mutants harboring plasmids derived from an Arabidopsis cDNA library, four unique plant cDNAs were identified. Two of them were specific for UV-light damage, and complemented both *UvrB⁻* and *UvrC⁻* phenotypes in the dark. These cDNAs showed no extensive amino acid homology with known DNA repair proteins. Although the light dependence of one cDNA activity was consistent with its identification as a photoreactivating enzyme, its predicted amino acid sequence did not resemble known photolyase sequences (Pang et al., 1992). The latter cDNA increased the resistance of *RecA⁻UvrB⁻Phr⁻* bacteria to mitomycin C and MMS as well as to UV light. This lack of specificity,

and its ability to increase resistance in both *UvrB*- and *UvrC*- mutants, suggested that cDNA activity might be complementing *RecA*-phenotypes. The partial complementation of three *RecA*-phenotypes could be due the activities of this gene in homologous recombination. The 395-amino acid open-reading frame encodes an apparent N-terminal chloroplast transit peptide and a putative 322-residue mature protein, with a conserved nucleotide-binding motif but otherwise little global homology with bacterial *RecA* proteins (Pang et al., 1993).

Using the same strategy, Machado et al. (1996) isolated a DNA repair-related gene from *Arabidopsis thaliana* that was able to complement bacteria defective in enzymes that play a part in the initial steps of base excision repair. The *E. coli* strain employed was the triple mutant BW535 (*xth, nfo, nth*), defective in the DNA repair endonucleases: exonuclease III, endonuclease IV and endonuclease III. These enzymes are involved in the first steps of base excision repair of DNA lesions normally mediated by oxidative and alkylation products (Doetsch and Cunningham, 1990). The mutant strain presents a hypersensitive phenotype to agents that produce oxygen radicals, such as hydrogen peroxide, and to alkylating agents, such as MMS (Cunningham et al., 1986). The screening was performed by transfecting a cDNA library from *Arabidopsis thaliana* into BW535 and selecting clones that had increased resistance to MMS. One clone was isolated and characterized. This *Arabidopsis* cDNA also confers MMS resistance to *E. coli* strain BW9109, which is defective only in the product of the *xth* gene (exonuclease III) and it is also able to enhance survival after UV irradiation of the UV-sensitive *uvrA* *E. coli* strain AB1886, defective in nucleotide excision repair. This lack of specific activities suggests a general role in DNA damage tolerance rather than damage removal. This cDNA is targeted to chloroplasts and mitochondria. Surprisingly, this cDNA was found to be a homologue of yeast thiamine biosynthesis genes, *THI4* from *S. cerevisiae* and *nmt2* from *S. pombe* that are involved in the formation of the thiazole precursor of thiamine. The ability of the *Arabidopsis* cDNA to functionally complement the yeast *thi4* disruption strain suggests that it has a similar role in plant thiamine biosynthesis, so it was named Thi1. In addition, the Thi4-deficient yeast strain also showed a phenotype of mitochondrial DNA instability after treatment with genotoxic drugs, such as MMS and after UV irradiation (Machado et al., 1997). This mitochondrial DNA instability phenotype was complemented by the *Arabidopsis* Thi1 gene (Machado et al., 1997). Thus, it appears that *Arabidopsis* Thi1 and *S. cerevisiae* Thi4 proteins have a dual role in DNA repair and thiamine biosynthesis.

CONCLUDING REMARKS

These examples demonstrate only part of the potential utilization of bacterial systems for the study of DNA repair genes. These techniques are facilitated by the ease and rapidity of bacterial manipulations and by our knowledge of *E. coli* DNA repair genes. These features have allowed bacteria to be used in cloning and complementation studies of both native and mutated gene products.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by Conselho Nacional de Pesquisas (Brazil), Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/COFECUB), the World Health Organization, Programa de Núcleos de Excelência and Pró-Reitoria de Pesquisa, Universidade Federal de Minas Gerais.

REFERENCES

- Aburatani, H., Hippo, Y., Ishida, T., Takashima, R., Matsuba, C., Kodama, T., Takao, M., Yasui, A., Yamamoto, K. and Asano, M. (1997). Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue. *Cancer Res* 57: 2151-2156.
- Arai, K., Morishita, K., Shinmura, K., Kohno, T., Kim, S.R., Nohmi, T., Tanigaki, M., Ohwada, S. and Yokota, J. (1997). Cloning of a human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage. *Oncogene* 14: 2857-2861.
- Aravind, L., Walker, D.R. and Koonin, E.V. (1999). Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res* 27: 1223-1242.
- Augusto-Pinto, L., Bartholomeu, D.C., Teixeira, S.M., Pena, S.D. and Machado, C.R. (2001). Molecular cloning and characterization of the DNA mismatch repair gene class 2 from the *Trypanosoma cruzi*. *Gene* 272: 323-333.
- Berdal, K.G., Bjoras, M., Bjelland, S. and Seeberg, E. (1990). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a gene for an alkylbase DNA glycosylase from *Saccharomyces cerevisiae*; a homologue to the bacterial Alka gene. *EMBO J* 9: 4563-4568.
- Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J. and Dizdaroğlu, M. (1992). Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry* 31: 106-110.
- Carell, T., Burgdorf, L.T., Kundu, L.M. and Cichon, M. (2001). The mechanism of action of DNA photolyases. *Curr Opin. Chem. Biol.* 5: 491-498.
- Chen, J., Derfler, B., Maskati, A. and Samson, L. (1989). Cloning a eukaryotic DNA glycosylase repair gene by the suppression of a DNA repair defect in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7961-7965.
- Chen, J., Derfler, B. and Samson, L. (1990). *Saccharomyces cerevisiae* 3-methyladenine DNA glycosylase has homology to the Alka glycosylase of *E. coli* and is induced in response to DNA alkylation damage. *EMBO J* 9: 4569-4575.
- Christians, F.C. and Loeb, L.A. (1996). Novel human DNA alkyltransferases obtained by random substitution and genetic selection in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6124-6128.
- Cleaver, J.E., Karplus, K., Kashani-Sabet, M. and Limoli, C.L. (2001). Nucleotide excision repair "a legacy of creativity". *Mutat. Res.* 485: 23-36.
- Cunningham, R.P., Saporito, S.M., Spitzer, S.G. and Weiss, B. (1986). Endonuclease IV (nfo) mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 168: 1120-1127.
- Doetsch, P.W. and Cunningham, R.P. (1990). The enzymology of apurinic/apyrimidinic endonucleases. *Mut. Res.* 336: 173-201.
- Dolan, M.E. and Pegg, A.E. (1997). O6-benzylguanine and its role in chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 3: 837-847.
- Dolan, M.E., Moschel, R.C. and Pegg, A.E. (1990). Depletion of mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity by O6-benzylguanine provides a means to evaluate the role of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5368-5372.
- Drummond, J.T., Li, G.M., Longley, M.J. and Modrich, P. (1995). Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science* 268: 1909-1912.
- Edara, S., Kanugula, S., Goodtzova, K. and Pegg, A.E. (1996). Resistance of the human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase containing arginine at codon 160 to inactivation by O6-benzylguanine. *Cancer Res.* 56: 5571-5575.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C. and Siede, W. (1995). *DNA Repair and Mutagenesis*. American Society for Microbiology, Washington DC, USA, pp. 91-225.
- Friedman, H.S., Kokkinakis, D.M., Pluda, J., Friedman, A.H., Coligor, I., Haglund, M.M., Ashley, D.M., Rich, J., Dolan, M.E., Pegg, A.E., Moschel, R.C., McLendon, R.E., Kerby, T., Herndon, J.E., Bigner, D.D. and Schold Jr., S.C. (1998). Phase I trial of O6-benzylguanine for patients undergoing surgery for malignant glioma. *J. Clin. Oncol.* 16: 3570-3575.
- Grossman, L. and Yeung, A.T. (1990). The UvrABC endonuclease of *Escherichia coli*. *Photochem. Photobiol.* 51: 749-755.
- Husain, I., Griffith, J. and Sancar, A. (1988). Thymine dimers bend DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2558-2562.
- Imai, Y., Oda, H., Nakatsu, Y. and Ishikawa, T. (1995). A polymorphism at codon 160 of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in young patients with adult type cancers and functional assay. *Carcinogenesis* 16: 2441-2445.
- Kohno, T., Shimura, K., Tosaka, M., Tani, M., Kim, S.R., Sugimura, H., Nohmi, T., Kasai, H. and

- Yokota, J. (1998). Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene* 16: 3219-3225.
- Kosa, J.L. and Sweasy, J.B. (1999). 3'-Azido-3'-deoxythymidine-resistant mutants of DNA polymerase beta identified by *in vivo* selection. *J. Biol. Chem.* 274: 3851-3858.
- Lahue, R.S., Au, K.G. and Modrich, P. (1989). DNA mismatch correction in a defined system. *Science* 245: 160-164.
- Machado, C.R., de Oliveira, R.L., Boiteux, S., Praekelt, U.M., Meacock, P.A. and Menck, C.F. (1996). Thi1, a thiamine biosynthetic gene in *Arabidopsis thaliana*, complements bacterial defects in DNA repair. *Plant Mol. Biol.* 31: 585-593.
- Machado, C.R., Praekelt, U.M., de Oliveira, R.C., Barbosa, A.C., Byrne, K.L., Meacock, P.A. and Menck, C.F. (1997). Dual role for the yeast Thi4 gene in thiamine biosynthesis and DNA damage tolerance. *J. Mol. Biol.* 273: 114-121.
- Marra, G. and Schär, P. (1999). Recognition of DNA alterations by the mismatch repair system. *Biochem. J.* 338: 1-13.
- Marsischky, G.T., Filosi, N., Kane, M.F. and Kolodner, R. (1996). Redundancy of *Saccharomyces cerevisiae* MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. *Genes Dev.* 10: 407-420.
- Memisoglu, A. and Samson, L. (1996). Cloning and characterization of a cDNA encoding a 3-methyladenine DNA glycosylase from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* 177: 229-235.
- Modrich, P. and Lahue, R. (1986). Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 101-133.
- Nakagawa, T., Abhijit, D. and Kolodner, R.D. (1999). Multiple functions of MutS and MutL related heterocomplexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14186-14188.
- O'Connor, T.R. (1993). Purification and characterization of human 3-methyladenine-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res.* 21: 5561-5569.
- O'Connor, T.R. and Laval, E. (1990). Isolation and structure of a cDNA expressing a mammalian 3-methyladenine-DNA glycosylase. *EMBO J.* 9: 3337-3342.
- Pang, Q., Hays, J.B. and Rajagopal, I. (1992). A plant cDNA that partially complements *Escherichia coli* recA mutations predicts a polypeptide not strongly homologous to RecA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8073-8077.
- Pang, Q., Hays, J.B., Rajagopal, I. and Schaefer, T.S. (1993). Selection of *Arabidopsis* cDNAs that partially correct phenotypes of *Escherichia coli* DNA-damage-sensitive mutants and analysis of two plant cDNAs that appear to express UV-specific dark repair activities. *Plant Mol. Biol.* 22: 411-426.
- Pegg, A.E. (2000). Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat. Res.* 462: 83-100.
- Perez, J., Gallego, C., Bernier-Villamor, V., Camacho, A., Gonzalez-Pacanowska, D. and Ruiz-Perez, L.M. (1999). Apurinic/apyrimidinic endonuclease genes from the Trypanosomatidae *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 27: 771-777.
- Popoff, S.C., Spira, A.I., Johnson, A.W. and Demple, B. (1990). Yeast structural gene (APN1) for the major apurinic endonuclease: homology to *Escherichia coli* endonuclease IV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4193-4197.
- Reenan, R.A. and Kolodner, R.D. (1992). Characterization of insertion mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* MSH1 and MSH2 genes: evidence for separate mitochondrial nuclear functions. *Genetics* 132: 975-985.
- Rosenquist, T.A., Zharkov, D.O. and Grollman, A.P. (1997). Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7429-7434.
- Samson, L., Derfler, B., Boosalis, M. and Call, K. (1991). Cloning and characterization of a 3-methyladenine DNA glycosylase cDNA from human cells whose gene maps to chromosome 16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9127-9131.
- Sancar, G.B. (1985). Expression of a *Saccharomyces cerevisiae* photolyase gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 161: 769-771.
- Santerre, A. and Britt, A.B. (1994). Cloning of a 3-methyladenine-DNA glycosylase from *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2240-2244.
- Sugimura, H., Kohno, T., Wakai, K., Nagura, K., Genka, K., Igarashi, H., Morris, B.J., Baba, S., Ohno, Y., Gao, C., Li, Z., Wang, J., Takezaki, T., Tajima, K., Varga, T., Sawaguchi, T., Lum, J.K., Martinson, J.J., Tsugane, S., Iwamasa, T., Shinmura, K. and Yokota, J. (1999). hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8: 669-674.
- Sweasy, J.B. and Loeb, L.A. (1992). Mammalian DNA polymerase beta can substitute for DNA polymerase I during DNA replication in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267: 1407-1410.
- Sweasy, J.B. and Loeb, L.A. (1993). Detection and characterization of mammalian DNA polymerase beta

- mutants by functional complementation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4626-4630.
- Xu-Welliver, M., Leitao, J., Kanugula, S., Meehan, W.J. and Pegg, A.E.** (1999). Role of codon 160 in the sensitivity of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase to O6-benzylguanine. *Biochem. Pharmacol.* 58: 1279-1285.
- van der Kemp, P.A., Thomas, D., Barbey, R., de Oliveira, R. and Boiteux, S.** (1996). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5197-5202.
- Washington, S.L., Yoon, M.S., Chagovetz, A.M., Li, S.X., Clairmont, C.A., Preston, B.D., Eckert, K.A. and Sweasy, J.B.** (1997). A genetic system to identify DNA polymerase beta mutator mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1321-1326.