

## Resumo

Estudos recentes realizados pelo nosso grupo demonstraram que a espécie *Trypanosoma cruzi* pode ser dividida em três haplogrupos distintos, denominados A, B e C. Essa classificação está baseada em uma extensa análise de microssatélites e polimorfismos de vários genes em diversas cepas desse parasita, incluindo o gene *MSH2*, que codifica um componente essencial da via de reparo de erros de pareamento (MMR). Tratamento com agentes genotóxicos sugeriu que cepas dos haplogrupos B e C apresentam menor eficiência de MMR se comparado com cepas do haplogrupo A. Esses resultados nos levaram a propor que essa menor eficiência de MMR poderia estar correlacionada à maior variabilidade genética encontrada nessas cepas, como demonstrado em estudos recentes sobre famílias de genes multicópias. Cabe notar que as cepas pertencentes ao haplogrupo C estão normalmente associadas aos casos crônicos da doença de Chagas no Brasil. Portanto, é possível que essa maior variabilidade genética tenha contribuído para uma maior capacidade de adaptação dessas cepas ao ciclo doméstico da doença de Chagas.

Como cada um dos haplogrupos é caracterizado por uma isoforma distinta de *MSH2*, decidimos aprofundar a caracterização dessa proteína e investigar se ela poderia ser responsável pelas possíveis diferenças de MMR entre haplogrupos. O *MSH2* foi amplificado a partir de DNA genômico das cepas de *T. cruzi* Colombiana (haplogrupo A) e CL Brener (uma cepa híbrida apresentando os alelos de *MSH2* dos haplogrupos B e C) e sua região codificadora foi seqüenciada. Foram encontradas 29 substituições de aminoácidos entre o *MSH2* dessas cepas, algumas delas em regiões descritas como importantes para a manutenção da estrutura ou função dessa

proteína. Análises *in silico* indicaram que as diferenças entre o *MSH2* de Colombiana e CL Brener não levam a alterações estruturais. Visando verificar sua atividade *in vitro*, o *MSH2* dessas cepas foi expresso em *E. coli* e as proteínas recombinantes utilizadas em um ensaio funcional de hidrólise de ATP. A proteína *MSH2* de Colombiana apresentou maior atividade ATPásica *in vitro* quando comparada à de CL Brener, sugerindo que os SNPs encontrados podem ser responsáveis pelas diferenças observadas nas respostas a tratamentos com agentes genotóxicos.

Visando comparar a atividade do *MSH2* de CL Brener e Colombiana *in vivo* optamos pela expressão heteróloga dessas isoformas de *MSH2* de *T. cruzi* em linhagens de *Trypanosoma brucei MSH2* *-/-*. Entretanto, as análises de instabilidade de microssatélite e tratamento com MNNG indicaram que a complementação da via de MMR em *T. brucei* através da expressão de *MSH2* de *T. cruzi* não é possível. Por outro lado, esse modelo nos permitiu avaliar a participação do *MSH2* na resposta ao estresse oxidativo nesse parasita. Semelhante ao observado com linhagens de *T. cruzi MSH2* *+/-*, linhagens de *T. brucei MSH2* *-/-* são mais susceptíveis ao tratamento com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) do que células selvagens. Ensaio com células de *T. brucei MLH1* *-/-* demonstraram que *MLH1*, uma proteína que atua juntamente com o *MSH2* no MMR, não está envolvida nesse processo. O fato do *MSH2* de *T. cruzi* não ter sido capaz de complementar a via de MMR em *T. brucei MSH2* *-/-*, associado à não participação do *MLH1* na resposta a tratamento com  $H_2O_2$ , nos levou a propor que, em tripanossomatídeos, *MSH2* teria um papel adicional na resposta a estresse oxidativo, sendo essa uma função independente do MMR.

## Abstract

Recent studies carried out by our group have demonstrated that the species *T. cruzi* can be divided into three distinct haplogroups, named A, B and C. This division was based upon extensive analyses carried out in several *T. cruzi* strains of microsatellites and polymorphisms found among various genes, including the *MSH2* gene, which encodes a key component of the mismatch repair pathway (MMR). Treatment of parasite cultures with genotoxic agents also suggested that strains belonging to haplogroups B and C present a less efficient MMR when compared to the haplogroup A strains. These results led us to propose that the lower MMR efficiency found in haplogroups B and C could imply in a greater genetic variability in these strains, as indicated by the studies of multigene families present in the *T. cruzi* genome. It should be noted that strains belonging to haplogroup C are more frequently associated with chronic cases of Chagas disease in Brazil. Thus, it is possible that this higher genetic variability has contributed to a greater adaptation of these strains to the domestic cycle of Chagas disease.

Since each haplogroup is characterized by a distinct *MSH2* isoform, we decided to further characterize the *T. cruzi* *MSH2* and investigate its role in generating the differences in MMR found between the haplogroups. The *MSH2* gene was amplified from the genome of two *T. cruzi* strains, Colombiana (haplogroup A) and CL Brener (a hybrid strain that contains *MSH2* alleles belonging to haplogroups B and C) and their whole coding region was sequenced. We have found 29 aminoacid substitutions between the *MSH2* from these strains, some of them in regions described as important for the proteins structural or functional maintenance.

*In silico* analysis indicated that the differences found between the *MSH2* of Colombiana and CL Brener do not lead to alterations in protein structure. ATPase assays performed with recombinant proteins purified from *E. coli* indicated that Colombiana's *MSH2* presents a higher activity *in vitro* compared to CL Brener's *MSH2*, suggesting that the SNPs in these strains *MSH2* could account for the differences in the response to treatment with genotoxic agents.

To compare the activity of CL Brener and Colombiana's *MSH2 in vivo*, a second approach involving the expression of these proteins in *Trypanosoma brucei* *MSH2* knockout cells was attempted. However, this approach was not successful because microsatellite instability and MNNG resistance assays indicated that the complementation of the MMR pathway in *T. brucei* through the expression of *T. cruzi* *MSH2* is not possible. On the other hand, this model allowed us to evaluate the role of *MSH2* in the response to oxidative stress in these parasites. Similar to *T. cruzi* *MSH2*  $-/+$  single knockout cells, *MSH2*  $-/-$  *T. brucei* cells are more sensitive to treatment with hydrogen peroxide than wild type cells. *MLH1*, the *MSH2* counterpart in MMR, is not involved in this process, as shown by the analyses with *T. brucei* *MLH1*  $-/-$  knockout cells. Since *MSH2* from *T. cruzi* was unable to complement microsatellite instability and MNNG resistance in *T. brucei* *MSH2*  $-/-$  cells, and *MLH1* is not involved in the response to hydrogen peroxide treatment, we propose that, in trypanosomatids, *MSH2* has an additional role in the response to oxidative stress, which is independent from MMR.