

RESUMO

As células dispõem de diversos sistemas para proteger o material genético dos danos causados por agentes ambientais ou por produtos provenientes do próprio metabolismo. Entre esses sistemas, encontramos o reparo de DNA, constituído por diferentes proteínas que atuam em diversas vias enzimáticas, de acordo com o tipo de lesão gerada.

Cada vez torna-se mais evidente a importância de estudos envolvendo fatores associados a sistemas que “protegem” o material genético, a fim de evitar doenças genéticas ou desordens que podem resultar na morte do organismo. Diante deste fato, faz-se necessário a caracterização de novos genes envolvidos no processo de manutenção da estabilidade genômica. Esse trabalho apresenta a caracterização funcional de dois genes, ambos envolvidos na manutenção da estabilidade genômica: o *hHC1* humano e o da DNA polimerase γ -PAK de *Trypanosoma cruzi*.

O gene *hHC1* (human heterologous complementation gene 1), isolado a partir de uma biblioteca de cDNA humano fetal, foi capaz de corrigir o fenótipo de sensibilidade ao agente genotóxico metil-metano sulfonato (MMS) de uma cepa de *E. coli*, deficiente no reparo por excisão de base. A seqüência nucleotídica deste clone revelou a presença de três janelas abertas de leitura. Cada uma das JALs foi testada em curvas de sobrevivência e somente a maior delas, com 60 aminoácidos, apresentou a atividade de complementação funcional em bactérias. Além disso, esse gene foi capaz de complementar funcionalmente a deficiência em genes envolvidos no reparo por excisão de nucleotídeos, *in vivo* e *in vitro*, após o tratamento com a luz UV.

O gene da DNA polimerase γ -PAK de *Trypanosoma cruzi*, o causador da doença de Chagas, codifica uma enzima que apresenta atividade de polimerase com baixa capacidade de distinção entre seus substratos, ou seja, é uma DNA polimerase mais permissiva. Provavelmente ela possa atuar como uma enzima “acessória”, que “resolve” estruturas pouco usuais, que normalmente não seriam resolvidas pela DNA polimerase α .

Portanto, nesse trabalho, iniciamos a caracterização, com experimentos *in vivo* e *in vitro*, de dois genes, um humano e outro de *Trypanosoma cruzi*,

envolvidos na manutenção da estabilidade do genoma. O entendimento sobre os processos de replicação e reparo do DNA é fundamental para entendermos a variabilidade genética em *T. cruzi*, assim como, para o estudo de possíveis drogas para o tratamento da doença de Chagas. Por outro lado, o estudo de genes humanos nos permite entender o desenvolvimento desse organismo e, também, de possíveis doenças associadas com a atividade de genes relacionados ao metabolismo do DNA.

ABSTRACT

The cells presents diverse systems able to protect the genetic material of the actual damages for ambient agents or products proceeding from the proper metabolism. The DNA repair system consists in sets of different proteins, which

that, depending on the nature of their enzymatic activity, acts in diverse enzymatic pathways in order to correct most of generated injuries.

Each time becomes more evident the importance of studies involving factors associates the systems that "protect" the genetic material, in order to prevent genetic illnesses or can result in the death of the organism. Ahead of this fact, the characterization of new involved genes in the process of maintenance of the genomic stability becomes necessary.

In this work we describe the initial characterization of two genes, both involved ones in the maintenance of the genomic stability: the human *hHC1* (human heterologous complementation gene 1) and of the DNA polymerase γ -PAK of *Trypanosoma cruzi*.

The *hHC1* gene, isolated from a fetal human cDNA library, shown able to correct sensitivity phenotype caused by the genotoxic agent methyl-methane sulfonate (MMS), of one *E.coli* strain, deficient in base excision repair pathway. The nucleotide sequence of this clone disclosed the presence of three ORFs (open reading frame). Each one of the JALs was tested in survival curves and only the biggest, with 60 amino acids, exhibits the functional complementation activity in mutant *E.coli* strains. Moreover, this gene was able to complemente different strains deficient in different steps of nucleotide excision repair, *in vivo* and *in vitro* experiments, after the treatment with UV light.

The DNA polymerase γ -PAK gene of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, codifies an enzyme that presents polymerase activity with low capacity of distinction between its substracts, and seams to be a more permissive DNA polymerase. Probably it could acts as "an accessory" enzyme, that would resolves unusual structures in DNA, that would normally not be resolved by the DNA polymerase β .

Therefore, in this work, we initiate the characterization, by *in vivo* and *in vitro* assays, of two genes: one human and another from *Trypanosoma cruzi*, both involved in the maintenance of the stability of the genomes. The agreement on the processes of response and repair of the DNA is a basic matter to better understand the genetic variability in *T. cruzi*, as well as, for the study of possible drugs for the treatment of the Chagas disease. In addition , the study of human fetal genes could consists in a important tool for the

elucidation of the embryonic development of this organism and, also, elucidation of possible illnesses associates with the activity of genes related of DNA metabolism.