

RAPHAEL SOUZA PAVANI

Caracterização da interação RPA-1-telômero em  
*Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

São Paulo  
2014

RAPHAEL SOUZA PAVANI

Caracterização da interação RPA-1-telômero em  
*Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Dra. Maria Carolina Q. B. Elias Sabbaga

Versão original

São Paulo  
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Pavani, Raphael Souza.

Caracterização da interação RPA-1- telômero em *Trypanosoma cruzi*  
/ Raphael Souza Pavani. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Maria Carolina Quartim Barbosa Elias Sabbaga.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Controle da replicação do DNA em tripanossomatídeos.

Versão do título para o inglês: Characterization of RPA-1-telomere interaction in *Trypanosoma cruzi*.

1. RPA-1 2. Telômeros 3. *Trypanosoma cruzi* 4. Tripanossomatídeos  
5. Terminais cromossômicos 6. RPA I. Sabbaga, Profa. Dra. Maria Carolina Quartim Barbosa II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB072/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Raphael Souza Pavani.

Título da tese: Caracterização da interação RPA-1-telômero em  
*Trypanosoma cruzi*.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Carolina Quartim Barbosa Elias Sabbaga.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,  
em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

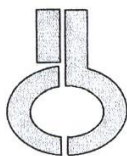
**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 512/12 referente ao projeto intitulado: "*Envolvimento do complexo RPA e da proteína Orc1/Cdc6 na replicação dos terminais de cromossomos em Trypanosoma cruzi*" sob a responsabilidade de **Raphael Souza Pavani**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 28 de março de 2012.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO  
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

**À minha mãe Marilene e meu pai Cláudio**

**À Ana Clara F. B. Araujo**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus por iluminar meu caminho a cada dia que se passa.

Aos meus pais que sempre me apoiaram em todas as decisões na minha vida. Mãe, você é a pessoa mais importante da minha vida, agradeço a cada momento que passamos juntos, toda dedicação que você teve na minha educação, todo respeito que me ensinou, todas as pedras que você me ajudou a retirar do caminho e todo esforço que você e meu pai tiveram para eu sempre ter o melhor. Passamos por momentos difíceis e graças ao nosso amor, superamos todas as barreiras da vida, muito obrigado! Pai, você foi uma pessoa muito especial na minha vida, a melhor pessoa que conheci até hoje. Gostaria de agradecer por toda dedicação e aprendizado, com certeza meus melhores adjetivos são apenas reflexo de tudo que eu aprendi ao seu lado nesses 20 anos que passamos juntos. Espero que você esteja feliz e acompanhando aí de cima mais uma etapa cumprida na minha vida. Sinto muito a sua falta.

Ao amor da minha vida, Ana Clara, que me ilumina com seu sorriso todos os dias, me levanta quando estou pra baixo, abre meus olhos quando estou agindo de forma errada, me faz feliz de uma forma que nenhuma outra pessoa consegue. Muito obrigado por compartilhar comigo o amor, a felicidade, o amor pela ciência, por aceitar meus defeitos e por compreender a paixão que eu tenho pelo que faço. Agradeço todos os dias por ter uma pessoa tão boa e especial do meu lado. Que nossa nova fase que se inicia agora traga mais felicidade e seja repleta de conquistas.

À minha orientadora, Carol Elias, que encarou o desafio de me orientar em uma área diferente da sua principal linha de pesquisa, sem medir esforços para me ajudar a tentar compreender melhor essa loucura que é o mundo molecular dos telômeros dos tripanossomas. Não tenho palavras para descrever sua dedicação, atenção e carinho ao meu trabalho. Muito obrigado por todo apoio, discussões, correções, idéias, planos e oportunidades, com certeza você aprimorou muito meu gosto pela ciência. Que esses próximos 4 anos que virão possam render ainda mais frutos e idéias.

Aos alunos da Dra. Carol. Ricardo, muito obrigado pela amizade, atenção, discussões, aprendizado e apoio, te desejo muita sorte no pós doc que está

começando, você sabe que pode contar comigo para o que for preciso. Daiane, obrigado por toda a ajuda e amizade, te desejo muita felicidade na sua nova fase da vida nos EUA. Simone, apesar de termos convivido relativamente pouco tempo, gosto muito de você, muito obrigado por sempre me ajudar, me ensinar, me dar dicas e pela amizade. Te desejo muitas felicidades ao lado do Wagner e dessas duas princesas que surgiram na sua vida. Marina, apesar de termos convivido relativamente pouco também, já deu para perceber que você é uma ótima pessoa e tem muito talento para a ciência, espero que continuemos a trabalhar no mesmo grupo e muitas felicidades com seu baby! Vocês todos ajudam muito o meu dia a dia e tornam o laboratório um lugar agradabilíssimo. Teresa, “very crazy”, muito obrigado por toda a ajuda nas imagens e discussões e pela amizade, grande beijo!

À minha família, por sempre apoiar minhas decisões e por todo o carinho.

À minha segunda família, os moradores e ex moradores da República Manguaça de Botucatu. Nossa irmandade nos fortalece a cada dia que se passa, obrigado por todo apoio e amizade.

À Dra. Maria Isabel Cano pela co-orientação, pelas discussões, ideias, experimentos, amizade e carinho. Bel, muito obrigado pela dedicação e atenção ao meu trabalho. Espero que continuemos colaborando, suas opiniões e discussões são muito importantes para nós. Ao Carlos Fernandes, Pituta, muito obrigado pela assistência nos ensaios de difração circular e por todas as nossas colaborações e amizade!

Aos meus queridos amigos do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, aos alunos do professor Hugo, Edu, Cecília, Matheus, Ju Dias, Ju Galvão. Aos alunos do Dr. Inácio, Diego, Polly, Ursula. Aos alunos da Dra. Marcela, Cris e Myriam. Aos alunos da Dra. Solange, Lú, Ana Karina, Milene, Édson, Eduardo, André, Débora. Ao Bruno, aluno da Dra. Vanessa. Aos alunos da Dra. Júlia, Mariana e Daniel. Aos alunos do Dr. Pedro, Tiago e Katiê. Aos técnicos do laboratório, Ivan, Mari, Ana Helena e Ismael. Um agradecimento especial ao Ivan pela paciência e boa vontade em me ensinar as técnicas de captura de imagens no microscópio e a Mari pelos meios de cultura e soluções. O trabalho de vocês facilita muito o andamento do nosso trabalho, muito obrigado. E muito obrigado a todos os pesquisadores citados que contribuem diariamente para nosso aprendizado. Vocês todos são muito importantes para o meu dia a dia, tanto em nível de trabalho e discussões, quanto



em nível de amizade. Com certeza nossa ótima convivência quebra um pouco do desgaste da rotina no laboratório.

Aos meus amigos de Santos, que sempre me recebem de braços abertos e me dão força e apoio.

Ao Dr. Luiz Tosi e seu grupo, pelas discussões e pelo anticorpo anti-RPA-1 utilizado nos ensaios de lâmina. Ao Dr. Sérgio Schenkman, pelo anticorpo anti-flagelo. Ao Dr. Oswaldo Sant'Anna pela produção do anticorpo Anti-TcRPA-1.

À FAPESP pelo suporte financeiro.

## RESUMO

PAVANI, R. S. **Caracterização da interação RPA-1-telômero em *Trypanosoma cruzi***. 2014. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afligindo diversas regiões do mundo, com foco principal na América Latina. Apesar dos avanços, aproximadamente oito milhões de pessoas estão infectadas com essa enfermidade. O estudo da biologia molecular desse parasito poderá facilitar o descobrimento de novas terapias, bem como auxiliar na compreensão da evolução molecular dos organismos eucariotes. O complexo telomérico, responsável pela integridade e estabilidade genômica, é formado pela interação de DNA com proteínas, que são responsáveis pela manutenção e proteção desses terminais. O complexo RPA de eucariotes compreende um heterotrîmero, formado pelas proteínas RPA-1, RPA-2 e RPA-3 que cumpre diversas funções vitais na célula, sendo uma peça fundamental na replicação, reparo e recombinação. Nos telômeros de mamíferos e leveduras, este complexo está envolvido principalmente com a replicação e reparo de DNA. As proteínas que interagem e protegem a fita simples presente nos telômeros de eucariotes são consideradas RPA-like devido a similaridades estruturais com componentes do complexo RPA. A ausência de homólogos destas proteínas no genoma de *T. cruzi* nos fez investigar se o próprio complexo RPA poderia cumprir funções diferenciadas nos terminais cromossômicos. O complexo RPA nunca foi estudado em *T. cruzi* e pouco se sabe sobre a biologia molecular dos telômeros neste organismo. A proteína RPA-1 é a principal responsável pela ligação do trîmero nas diversas regiões do DNA. Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar a interação TcRPA-1 – telômero e se iniciou com a produção e purificação da RPA-1 recombinante e anticorpos contra essa proteína. Ensaio de dicróismo circular mostraram que a rTcRPA-1 purificada estava corretamente enovelada e mudava ligeiramente de conformação com a adição de oligonucleotídeo com a sequência da fita rica em G telomérica. Através de ensaios de EMSA, foi confirmada a interação *in vitro* da rTcRPA-1 com as sequências teloméricas simples fita e especificidade pela fita rica em G telomérica. Através de ensaios de CHIP e FISH/IF na forma replicativa epimastigota, foi confirmada a interação *in vivo* dessa proteína com o telômero durante todo o ciclo celular, isto é, mesmo nas fases onde não ocorre replicação do DNA. Mais que isto, RPA-1 interage com telômero também na forma de vida não replicativa tripomastigota. A ausência de homólogos de proteínas que interagem com o *overhang* telomérico em tripanosomas, a interação específica RPA-1-telômero, e a sua presença nos telômeros da forma de vida não replicativa, bem como as peculiaridades estruturais da RPA-1, levam-nos a propor que essa proteína cumpre um papel distinto daquele descrito para eucariotes, podendo estar envolvida com a proteção dos telômeros neste organismo.

**Palavras-chave:** Telômeros. *Trypanosoma cruzi*. RPA-1. Doença de Chagas.

## ABSTRACT

PAVANI, R. S. **Characterization of RPA-1-telomere interaction in *Trypanosoma cruzi***. 2014. 87 p. Masters Thesis (Biology of Host-Pathogen Interaction) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, afflicting several regions of the world, with a primary focus in Latin America. Despite advances, approximately eight million people are infected with this disease. The study of the molecular biology of this parasite may facilitate the discovery of new therapies as well as assist in understanding the molecular evolution of eukaryotic organisms. The telomeric complex, responsible for the genomic integrity and stability, is formed by the interaction of DNA with proteins that are responsible for maintaining and protecting these terminals. The eukaryotic RPA complex comprises a heterotrimer, formed by RPA-1, RPA-2 and RPA-3, that fulfills several vital functions in the cell, being a fundamental player in DNA replication, repair and recombination. In mammals and yeast, the RPA complex is mainly involved with replication and repair in telomeres. In eukaryotes, the telomere overhang binding proteins are considered RPA-like due to structural similarities with components of the RPA complex. The absence of homologues of these proteins in the *T. cruzi* genome lead us to hypothesize that the RPA complex itself could fulfill different functions in chromosome terminals of these organisms. The RPA-1 protein is primarily responsible for the binding of the trimer into different regions of DNA. The RPA complex has never been studied in *T. cruzi* and little is known about the molecular biology of telomeres in this organism. This study aimed to characterize the TcRPA-1-telomere interaction and started with the production and purification of recombinant TcRPA-1 and antibodies against this protein. Circular dichroism showed that the purified rTcRPA-1 was in correct fold, and had some little conformational modifications with the addition of G-rich overhang sequence. Through EMSA assays, we confirmed the *in vitro* interaction of rTcRPA-1 with single-stranded telomeric sequences and specificity for the sequence present in telomeric G overhang. Through ChIP and FISH / IF assays in replicative epimastigote form, we confirmed the *in vivo* RPA-1-telomere interaction even in non-S phase of the cell cycle. Moreover, in trypomastigote non-replicative lifeform RPA-1-telomere interaction was also detected. The absence of homologous proteins that interact with telomeric overhang in trypanosomes, the specific RPA-1-telomere interaction, and the presence of this protein in tripomastigote telomeres, as well as structural peculiarities of the RPA-1, lead us to hypothesize that this protein may be involved in telomere protection in *T. cruzi*.

**Keywords:** Telomeres. *Trypanosoma cruzi*. RPA-1. Chagas disease.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATM: *ataxia telangiectasia mutated*

ATR: *ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*

ATRIP: ATR interacting protein

BSA: Soro albumina bovina

Cdc13: *Cell division cycle 13*

CTC-1: *conserved telomere maintenance component 1*

C-terminal: Carboxi-terminal

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP : desoxirribonucleosídeo trifosfatado

DO: Densidade Óptica

EDTA: Ácido etileno diamino tetra-acético

HCl: Ácido clorídrico

IPTG: Isopropyl-D-thiogalactopyranoside

Kb: kilobase

kDa: kilo Dalton

LB: Meio de cultura de bactérias (Luria Bertani)

Mb: Megabase

Mec1: *mytosis entry checkpoint*

Mre11: *Meiotic recombination 11*

N-terminal: Amino-terminal

Ob-fold: *Oligonucleotide/Oligosaccharide- Binding fold domain*

p53: *Cellular tumor antigen p53*

pb: Pares de bases

PBS: Phosphate buffered saline (solução salina tamponada com fosfato)

PCR: Reação de polimerase em cadeia

POT-1: *Protection of telomeres 1*

RAD (1,9,51): *Radiation sensitive*

RAP-1: *Repressor Activator Protein 1*

Rbp38: RNA-binding protein 38kDa

RPA: *Replication protein A*

rpm : Rotações por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio

Stn-1: *Suppressor of cdc thirteen*

TAE :Tris-Acetato-EDTA

TEBP: *Telomere end binding protein*

Tel1: Telomere maintenance

Ten1: *Telomeric pathways with Stn1*

TIN-2: *TRF-1 interacting protein 2*

TRF: *Telomere repeat binding factor*

U: Unidades

µg: Micrograma

µL: Microlitro

UV: Ultravioleta

VSG: *Variant Surface Glicoprotein*

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> - Componentes do meio LIT.....	37
<b>Tabela 3.2</b> - <i>Primers</i> utilizados para amplificação do fragmento TcRPA-1...	39
<b>Tabela 3.3</b> – Reagentes para ensaio DNA/proteína.....	47
<b>Tabela 3.4</b> – Reagentes e concentração de competidores utilizados nas competições em ensaios de EMSA.....	48
<b>Tabela 3.5</b> - Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de EMSA .....	49

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1-</b> Estrutura do DNA telomérico e possíveis estruturas secundárias formadas.....	20
<b>Figura 1.2-</b> Proteínas interatoras dos telômeros em diferentes organismos.....	21
<b>Figura 1.3-</b> Semelhança de organização de domínios do complexo CST e RPA.....	23
<b>Figura 1.4-</b> Organização estrutural de domínios do complexo RPA.....	25
<b>Figura 1.5-</b> Envolvimento do complexo RPA em resposta a quebra de dupla fita de DNA e danos no telômero.....	28
<b>Figura 1.6-</b> Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....	30
<b>Figura 1.7-</b> Estrutura da proteína RPA-1 de tripanossomatídeos.....	34
<b>Figura 4.1-</b> Alinhamento das sequências das proteínas TcRPA-1 e LaRPA-1.....	54
<b>Figura 4.2-</b> Amplificação genômica do fragmento da TcRPA-1.....	55
<b>Figura 4.3-</b> Purificação do fragmento TcRPA-1 e digestão da construção TcRPA-1 + pET-28(a+).....	56
<b>Figura 4.4-</b> Eluatos da coluna Q-Sepharose (Troca iônica).....	57
<b>Figura 4.5-</b> Purificação da proteína rTcRPA-1 em coluna de afinidade.....	58
<b>Figura 4.6-</b> Espectro de CD da proteína rTcRPA-1.....	59
<b>Figura 4.7-</b> Soro anti-RPA-1 reconhece rTcRPA-1 após 20 dias de inoculação.....	60
<b>Figura 4.8-</b> A proteína TcRPA-1 é reconhecida pelo soro Anti-RPA-1 .....	60
<b>Figura 4.9-</b> RPA-1 está associada ao DNA em diferentes fases do ciclo celular da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> .....	61
<b>Figura 4.10-</b> TcRPA-1 interage com fita simples telomérica rica em G e rica em C <i>in vitro</i> .....	62
<b>Figura 4.11-</b> Ensaios de competição feitos com a fita rica em G telomérica.....	65
<b>Figura 4.12-</b> TcRPA-1 é capaz de interagir com apenas uma repetição telomérica....	66

<b>Figura 4.13-</b> A proteína TcRPA-1 imunoprecipitou a sequência telomérica .....	67
<b>Figura 4.14-</b> A proteína TcRPA-1 co-localiza com o DNA telomérico in vivo .....	68
<b>Figura 4.15-</b> TcRPA-1 interage com DNA telomérico na forma tripomastigota .....	69
<b>Figura 4.16-</b> Proteína TcRPA-1 co-localiza com centros de replicação em epimastigota.....	70
<b>Figura 5.1-</b> Possível modelo esquemático do telômero de <i>T. cruzi</i> .....	74
<b>Figura 5.2-</b> Modelo esquemático da RPA-1 sinalizando reparo nos terminais cromossômicos da forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> .....	75



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1 <b>Complexo Telomérico</b> .....	19
1.2 <b>Proteínas que interagem com os telômeros</b> .....	20
1.3 <b>Complexo RPA</b> .....	24
1.4 <b>Complexo RPA nos telômeros</b> .....	26
1.5 <b><i>Trypanosoma cruzi</i> - Doença de chagas</b> .....	28
1.6 <b>Região subtelomérica e telômeros em tripanossomatídeos</b> .....	30
1.7 <b>RPA-1 em tripanossomatídeos</b> .....	32
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	36
2.1 <b>Objetivos Gerais</b> .....	36
2.2 <b>Objetivos Específicos</b> .....	36
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
3.1 <b>Epimastigotas</b> .....	37
3.1.1 <b>Meio LIT</b> .....	37
3.2 <b>Tripomastigota</b> .....	37
3.3 <b>Extração de DNA genômico dos parasitas</b> .....	38
3.4 <b>Preparo de Bactérias Termocompetentes (<i>Escherichia coli</i>)</b> .....	38
3.4.1 <b>Transformação de Bactérias Competentes por Choque Térmico</b> .....	39
3.5 <b>Amplificação, clonagem e subclonagem da TcRPA-1</b> .....	39
3.5.1 <b>Amplificação por PCR e clonagem no vetor TOPO</b> .....	39
3.5.2 <b>PCR</b> .....	40
3.5.3 <b>Subclonagem do fragmento TcRPA-1 no vetor de expressão pET-28 (a+)</b> .....	40
3.5.4 <b>Lise Alcalina</b> .....	41
3.6 <b>Expressão das proteínas recombinantes rTcRPA-1</b> .....	41
3.7 <b>Purificação da proteína rTcRPA-1</b> .....	42
3.8 <b>Produção do Anti-RPA-1</b> .....	43

3.9 Ensaio de ELISA .....	43
3.10 Western Blotting .....	44
3.11 Dicroísmo Circular.....	44
3.12 Extrato diferencial .....	45
3.13 Ensaio de EMSA .....	46
3.13.1 Obtenção dos oligonucleotídeos marcados .....	46
3.13.2 Obtenção dos oligonucleotídeos de dupla fita .....	46
3.13.3 Interação DNA/ proteína.....	47
3.13.4 Ensaio de Competição da interação DNA/proteína .....	48
3.14 Imunofluorescência.....	49
3.15 Imunoprecipitação de cromatina.....	50
3.15.1 Obtenção da Cromatina .....	50
3.15.2 Imunoprecipitação da Cromatina.....	50
3.15.3 Purificação do DNA com fenol/clorofórmio .....	51
3.15.4 Hibridização com Sondas de DNA.....	51
3.16 Imunofluorescência acoplada a FISH .....	52
3.17 Ensaio de incorporação de EdU acoplado a imunofluorescência .....	53
4 RESULTADOS .....	54
4.1 Análise <i>in silico</i> e PCR do fragmento que codifica TcRPA-1 .....	54
4.2 Clonagem do fragmento da TcRPA-1 no vetor TOPO e subclonagem no vetor de expressão pET-28(a+) .....	55
4.3 Expressão e purificação da proteína rTcRPA-1 .....	56
4.4 Análise da estrutura secundária da proteína rTcRPA-1 por espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) .....	58
4.5 Anti-RPA-1 reconhece rTcRPA-1 em ensaios de ELISA .....	59
4.6 Anti-RPA-1 reconhece rTcRPA-1 e TcRPA-1 de extrato de <i>T. cruzi</i> em ensaios de Western Blotting.....	60

4.7 A proteína TcRPA-1 possui localização nuclear e interage com o DNA em todas as fases do ciclo celular .....	61
4.8 rTcRPA-1 interage com fita simples telomérica <i>in vitro</i> .....	62
4.9 rTcRPA-1 possui especificidade pela fita rica em G telomérica.....	63
4.10 Basta apenas uma repetição TTAGGG para a rTcRPA-1 interagir com o DNA telomérico .....	66
4.11 TcRPA-1 interage <i>in vivo</i> com os telômeros da forma epimastigota.....	67
4.12 TcRPA-1 interage <i>in vivo</i> com as formas tripomastigotas .....	68
4.13 TcRPA-1 participa da replicação do DNA .....	69
5 DISCUSSÃO .....	71
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	76
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXO- Certificado de prêmios em congressos .....	86

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Complexo Telomérico

Telômeros são complexos DNA-proteína localizados na extremidade dos cromossomos eucarióticos e são responsáveis pela proteção destas extremidades contra degradação, recombinação e fusão com outros cromossomos. Esta estrutura é essencial para a completa replicação do DNA durante a divisão celular e está associada a vários processos importantes como controle do número de divisões celulares, envelhecimento celular, regulação da transcrição de genes adjacentes, além da manutenção da integridade genômica e da arquitetura nuclear (CHAN; BLACKBURN, 2004; DMITRIEV et al., 2003).

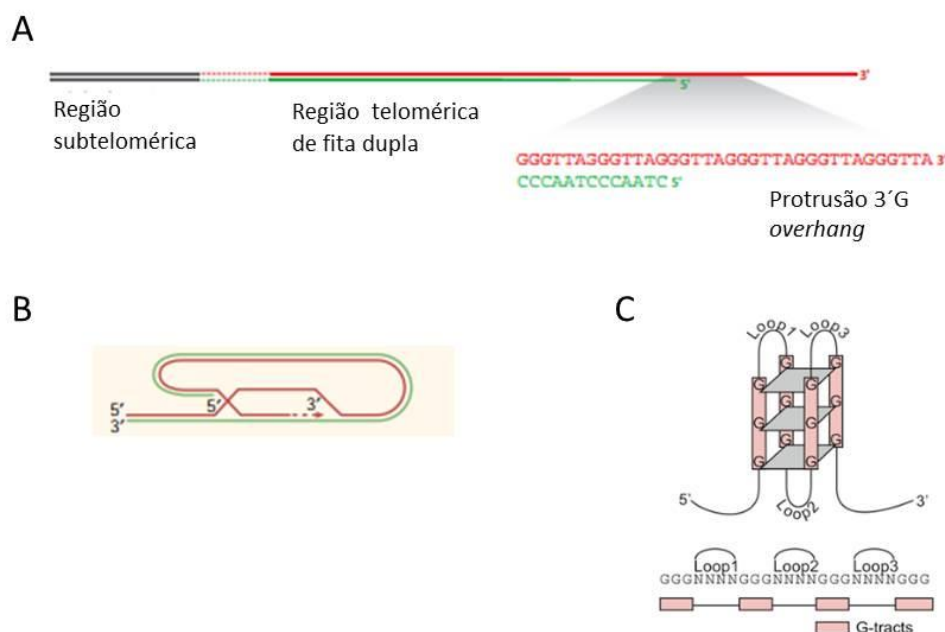
O DNA telomérico é constituído por repetições 5'-TTAGGG-3' altamente conservadas em uma ampla gama de organismos eucarióticos. Devido à alta presença de guanosinas nessas repetições, a fita de DNA que contém essa sequência é denominada fita G telomérica e sua sequência complementar, rica em citosinas é chamada de fita C telomérica (PALM; DE LANGE, 2008). Além da região de dupla fita, o DNA telomérico termina com uma protrusão 3' de fita simples denominada "3' G-overhang", por conter a sequência da fita G (Figura 1.1, A).

O *overhang* telomérico serve como substrato para alongação dos telômeros pela enzima telomerase. Esta enzima reconhece o *overhang* telomérico com a ponta 3' livre e adiciona repetições teloméricas à essa região para alongar o tamanho do telômero. Após a síntese da fita G pela telomerase, a fita C complementar é sintetizada pela maquinaria de replicação convencional da célula (STEWART et al., 2012; WU; TAKAI; DE LANGE, 2012).

A protrusão "3' G-overhang" também pode assumir conformações secundárias como *t-loops* (invasão da fita simples na fita dupla formando uma estrutura em laço) ou G-quadruplexes de fita simples ("G-quartet" ou G4 DNA) observadas em humanos, leveduras e *Trypanosoma brucei* (Figura 1.1, B e C).

A formação destas estruturas e as proteínas que interagem com os telômeros auxiliam na proteção do DNA telomérico, como será discutido adiante. Além disso, estas estruturas também participam no controle negativo do acesso da telomerase ao DNA telomérico, auxiliando na regulação da atividade desta enzima (CHAN;

BLACKBURN, 2004; GILSON; GELI, 2007; GRIFFITH et al., 1999; MUNOZ-JORDAN et al., 2001; SMOGORZEWSKA; DE LANGE, 2004).



**Figura 1.1- Estrutura do DNA telomérico e possíveis estruturas secundárias formadas.**

Em A, esquema representativo da organização do DNA no telômero. Em B, estrutura do t-loop, em C, estrutura G quadruplex (CAPRA et al., 2010; DE LANGE, 2004; PALM; DE LANGE, 2008).

O tamanho dos telômeros é diferente entre os organismos. O DNA telomérico fita dupla em *S. cerevisiae* e *S. pombe* possui aproximadamente 300pb, enquanto em mamíferos possui de 5-15kb (BONETTI et al., 2013). O tamanho da protrusão G *overhang* também varia, em *S. cerevisiae* essa região contém 12-14nt, podendo aumentar de 30-100nt no fim da fase S (LARRIVÉE; LEBEL; WELLINGER, 2004; WELLINGER; WOLF; ZAKIAN, 1993). Em mamíferos, o *overhang* é 30-500nt mais longo e parece aumentar no fim da fase S, começo da fase G2 do ciclo celular (CHAI et al., 2006; DAI et al., 2010). O encurtamento dos telômeros, quando ultrapassa o limiar aceitável pela célula, dispara uma resposta a danos no DNA nessa região, levando a célula a senescência (DI FAGAGNA et al., 2003; HERBIG et al., 2004).

## 1.2 Proteínas que interagem com os telômeros

As proteínas interatoras dos telômeros apresentam diversas funções, entre as principais, podemos citar a função de proteção dos terminais: i - contra ataques nucleolíticos, ii - contra a maquinaria de reparo, que reconheceria essa região como



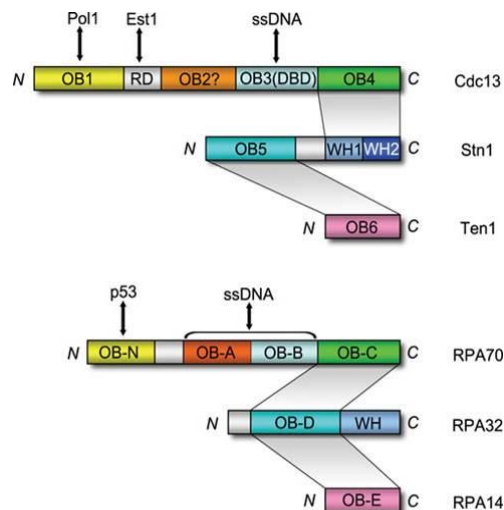
heterodímero com POT1, mas não liga diretamente o DNA) e a proteína TIN2, que apesar de não ligar diretamente o DNA telomérico, interage com TRF-1, TRF-2 e TPP1, estabilizando estes complexos. Parece assim que TPP1 é o elo de comunicação entre as proteínas que interagem com a dupla e simples fita teloméricas (YE et al., 2004).

O heterodímero POT1-TPP1 é responsável tanto pela proteção do telômero, quanto pelo recrutamento da telomerase (TEJERA et al., 2010; XIN et al., 2007). A proteína POT1 possui forte afinidade pela fita G telomérica, e se liga ao *overhang* utilizando um domínio OB-fold (LOAYZA et al., 2004). A proteína TPP1 interage diretamente com a subunidade catalítica da telomerase e é responsável pelo seu recrutamento. A presença do complexo POT1-TPP1 aumenta a processividade da telomerase durante a extensão dos telômeros (LATRICK; CECH, 2010). A ausência de POT-1 deixa os telômeros desencapados, ativando a resposta a danos no DNA via ATR, induzindo recombinação homóloga aberrante nos terminais cromossômicos (WU et al., 2006).

Outro complexo de proteínas descrito na literatura que interage com os telômeros é chamado de complexo CST. Ele foi descoberto primeiramente em *Saccharomyces cerevisiae*, onde é composto por 3 proteínas: Cdc13, Stn1 e Ten1. Este complexo é considerado um heterotrímero telômero-específico RPA-like (figura 1.3), também chamado de t-RPA, por possuir semelhanças estruturais com os componentes do trímero (RPA-1, RPA-2 e RPA-3), que será discutido adiante (GAO et al., 2007; LEWIS et al., 2012).

O complexo CST (Cdc13, Stn1, Ten1) interage com o *overhang* telomérico, estando envolvido com proteção e replicação dessa região (LUE et al., 2013). Quando apenas Cdc13 está ligada ao *overhang*, essa proteína tem a capacidade de interagir com a subunidade Est 1 da telomerase e promover seu recrutamento. Após o telômero estar alongado, as proteínas Stn1 e Ten1 se ligam a Cdc13, formando o trímero CST e retiram a telomerase do telômero, recrutando a maquinaria de replicação responsável pela síntese da fita C complementar (CHURIKOV et al., 2013). Além disso, o trímero CST formado nos telômeros tem a função de proteção destes terminais contra o reconhecimento pela maquinaria de reparo. A ausência de Cdc13 nos telômeros dispara uma resposta de *checkpoint*, provocando uma parada no ciclo celular (LONGHESE, 2008).

A princípio, os pesquisadores achavam que o complexo CST era característico e restrito a leveduras de brotamento, porém foram encontrados homólogos de Stn1 e Ten1 (nomeados STN1 e TEN1) em *Schizosaccharomyces pombe* e depois em plantas e mamíferos (MIYAKE et al., 2009; SUROVTSEVA et al., 2009). Uma proteína com baixa homologia de sequência a Cdc13, chamada CTC1, forma o trímero com STN1 e TEN1, formando o complexo CST desses organismos (CHEN; REDON; LINGNER, 2012; MYIAKE et al., 2009). Em humanos, o complexo CST, chamado de hCST, é um terminador da atividade da telomerase. Sua ligação aumenta em *late S/G2*, coincidindo com o tempo em que a telomerase se desliga do telômero. Este complexo interage com POT1-TPP1 e com DNA da fita G nascente nos telômeros, inibindo a ligação da telomerase e, conseqüentemente, a continuação do alongamento dos telômeros. Após o desligamento da telomerase, o complexo hCST recruta a maquinaria de replicação para alongar a fita C complementar (CHEN; REDON; LINGNER, 2012). Mutantes de CTC-1 em células de mamífero que não conseguiam formar o complexo CST resultaram em disfunção telomérica, fusão de cromossomos, aumento da formação do *G-overhang* e diminuição da ligação da Polimerase  $\alpha$  a STN1, sugerindo que este complexo é essencial para a manutenção telomérica nestas células (GU et al., 2013).



**Figura 1.3 Semelhança de organização de domínios dos complexos CST e RPA.**

Os domínios Obfold estão representados pela sigla OB e as áreas sombreadas indicam os domínios responsáveis pela interação entre as subunidades do complexo (SUN et al., 2011).



Além das proteínas constituintes dos telômeros, outras proteínas interagem com essa região e, além disso, possuem também funções extra teloméricas como, por exemplo, o complexo RPA, proteínas da maquinaria de reparo como Ku70/80, entre outras. Os mecanismos que regulam as interações telômero-proteínas ainda não são totalmente conhecidos, porém modificações pós traducionais como fosforilações e ubiquitinações são cruciais para o acúmulo de certas proteínas nos telômeros durante alguma fase específica do ciclo celular (AUBERT; LANSDORP, 2008).

### 1.3 Complexo RPA

O complexo RPA é composto pelas subunidades proteicas RPA-1, RPA-2 e RPA-3 (figura 1.4), e apresenta múltiplas funções no metabolismo do DNA, participando das maquinarias de replicação, reparo, recombinação, transcrição, além de estar envolvida no mecanismo de *checkpoint*-parada do ciclo celular frente ao dano de DNA (FANNING; KLIMOVICH; NAGER, 2006; SMITH; ZOU; ROTHSTEIN, 2000; WOLD, 1997). Este complexo é conservado evolutivamente entre os eucariotos e interage com o DNA via domínios OB-fold, que interagem com DNA simples fita (BOCHKAREV; BOCHKAREVA, 2004).

O complexo RPA foi inicialmente identificado e purificado como um fator proteico necessário para iniciação e alongamento da replicação do DNA do vírus SV-40 (WOLD;KELLY, 1988). Com o avanço dos estudos na área de replicação, foi descoberto que o complexo RPA tem por função estabilizar a simples fita de DNA durante a replicação, além de estimular a atividade das polimerases alpha, delta e epsilon (FANNING; KLIMOVICH; NAGER, 2006; OAKLEY; PATRICK, 2010; WAGA; STILLMAN; 1994).

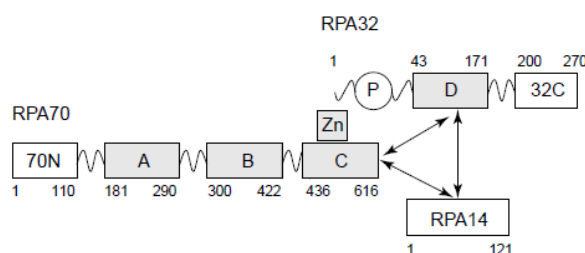
A maior subunidade do complexo RPA, é a RPA-1 (ou RPA70, de acordo com seu tamanho em kiloDaltons), que contém 4 domínios OB-fold: RPA-1 70N, RPA-1 A, RPA-1 B e RPA-1 C (Figura 1.4). O domínio RPA1-70N interage fracamente com o DNA simples fita, porém é responsável pela interação desta subunidade com a maquinaria de reparo de DNA e resposta de *checkpoint*, interagindo com proteínas como ATRIP, RAD9, p53, Mre11, entre outras. Esse domínio também é o responsável pela interação do complexo com fatores de transcrição e com a maquinaria de replicação, estimulando a atividade da DNA polimerase alfa

(FANNING; KLIMOVICH; NAGER, 2006, JACOBS et al., 1999). Os domínios RPA-1 A e RPA-1 B são os principais responsáveis pela interação da RPA-1 com o DNA simples fita (BOCHKAREVA et al., 2001). Já o domínio RPA-1 C, presente na região C-terminal da RPA-1, é responsável pela trimerização do complexo RPA, além de possuir motivo de ligação ao zinco, que foi ainda pouco estudado (BOCHKAREVA et al., 2002; OAKLEY; PATRICK, 2010).

A RPA-2 (ou RPA32) possui vários sítios de fosforilação, envolvidos no controle de sua regulação nas diferentes maquinarias da qual a RPA participa. O padrão de fosforilações varia, sendo diferente quando o complexo RPA está envolvido na replicação ou no reparo. A RPA-2 hiperfosforilada não co-localiza com centros de replicação e tem a afinidade reduzida pela polimerase alpha primase (ANANTHA, SOKOLOVA; BOROWIEC; 2008; FANNING; KLIMOVICH; NAGER, 2006; VASSIN; WOLD; BOROWIEC, 2004).

A RPA-2 também possui sítios de interação com proteínas e interage diretamente com proteínas de reparo como Uracil-DNA glicosilase, XPA, Rad9, entre outras (FANNING; KLIMOVICH; NAGER, 2006). Células em que a RPA-2 selvagem foi substituída por RPA-2 mutante nos sítios de fosforilação por ciclinas CDK são defeituosas no reparo de quebra de dupla fita que ocorrem durante a intérfase. Além disso, fosforilações em sítios específicos da RPA-2 estimulam novas fosforilações em outros sítios (ANANTHA; VASSIN; BOROWIEC, 2007).

A subunidade RPA-3 (ou RPA14) ainda é pouco estudada e parece estar envolvida na trimerização e estabilidade do complexo RPA (CAVERO; LIMBO; RUSSEL, 2010). As subunidades RPA-2 e RPA-3, apesar de não serem necessárias para a atividade de ligação de RPA-1 ao DNA, são extremamente importantes para as funções biológicas do complexo, pois contém regiões de interação do complexo RPA com outras proteínas (HENRICKSEN; UMBRICH; WOLD, 1994)



**Figura 1.4 Organização estrutural de domínios do complexo RPA.**

O Complexo RPA de mamíferos (RPA-1, RPA-2, RPA-3). O heterotrímero consiste em 6 domínios OB-fold (70N, A, B, C na RPA-1, D na RPA-2 e a subunidade RPA-3 consiste num único OBfold) característicos por sua forte

interação com o DNA simples fita e um domínio *winged helix turn helix* (Hth). As subunidades são conectados por links flexíveis. Os domínios OBfolds são (BOCHKAREV; BOCHKAREVA, 2004)

O complexo RPA é uma peça fundamental em resposta de reparo a danos no DNA, participando no reparo de excisão de nucleotídeos (MER et al., 2000; TSAALBI-SHTYLIK et al., 2014), reparo por excisão de bases (evidências de interação com glicosilases) (MER et al., 2000; PARKER et al., 2001), reparo *mismatch* (GENSCHEL; MODRICH, 2009; RAMILO et al., 2002), reparo em quebra de dupla fita de DNA e recombinação (DA SILVEIRA et al., 2013; MÜNCH et al., 2014; YAJIMA et al., 2013).

A participação do complexo RPA nos principais processos do metabolismo do DNA evidencia sua importância para a manutenção e viabilidade do DNA e, conseqüentemente, da célula eucariótica.

#### 1.4 Complexo RPA nos telômeros

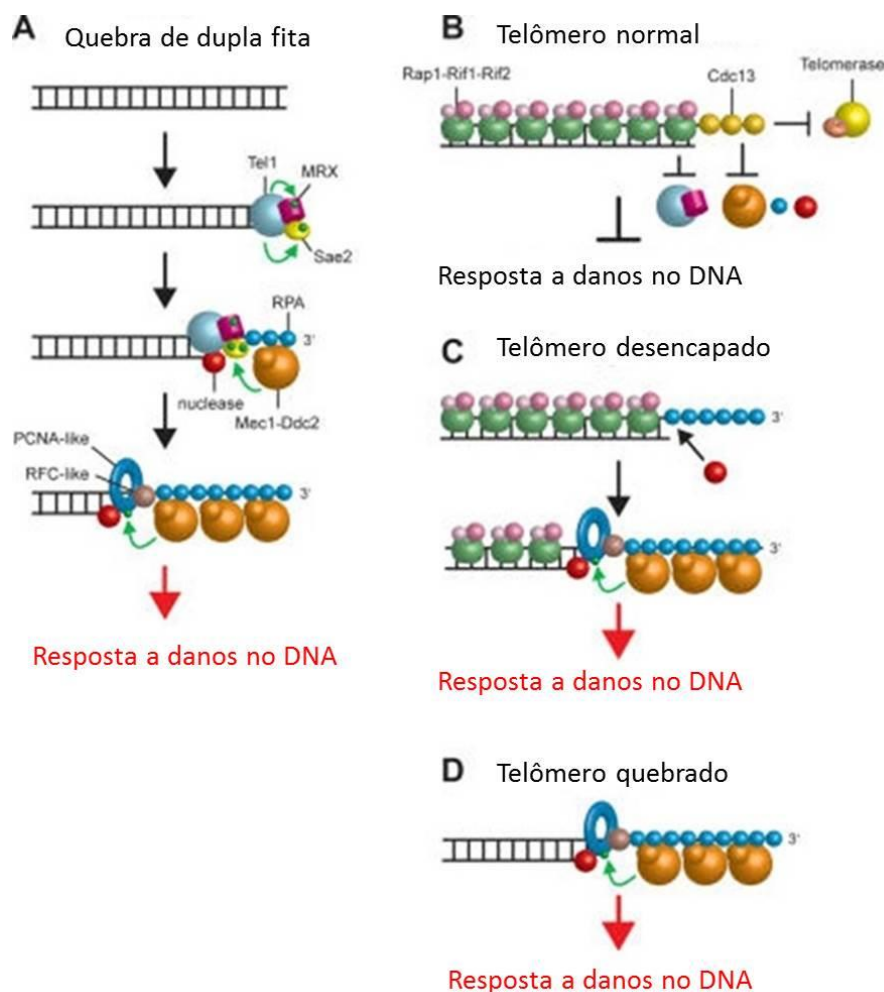
Nos telômeros de mamíferos e leveduras, além do papel de replicação (aumento da ligação RPA-telômero na fase S), já está bem descrito o papel da RPA na sinalização de danos na região telomérica (CHAI et al., 2006; VERDUN; KARLSEIDER, 2006; LUCIANO et al., 2012). A perda das proteínas POT-1 em mamíferos ou Cdc13 em *S. cerevisiae* (Figura 1.5), resulta em um acúmulo aberrante do complexo RPA nessa região, dando início ao recrutamento da maquinaria de reparo, disparando a via ATR, seguido do bloqueio do ciclo celular (FLYNN; CHANG; ZOU, 2012; LONGHESE, 2008).

Em leveduras, o complexo RPA está envolvido diretamente com a manutenção telomérica. Em *S. cerevisiae*, Schramke et al. em 2004 propuseram um modelo onde RPA está diretamente envolvida com o recrutamento da subunidade Est1 da telomerase para os telômeros. Neste contexto, RPA, Cdc13, Est1 e o *overhang* telomérico formam um complexo que ativa a telomerase. Recentemente, foi demonstrado que, além do papel de recrutamento e ativação da telomerase, o complexo RPA interage com TLC1 (RNA da telomerase de leveduras) via RFA-1 (Replication Factor-1, nome da RPA-1 neste organismo) e facilita a atividade desta enzima na elongação dos telômeros de leveduras de fissão e de brotamento (LUCIANO et al., 2012).

Em leveduras, mutantes de RFA-1 resultam em encurtamento telomérico (SMITH et al., 2000; KIBE et al., 2007). Além disso, mutações na região N-terminal de RFA-2 (RPA-2 de leveduras), que possui múltiplos sítios de fosforilação, resultam em encurtamento telomérico severo e diminuição da associação do complexo RPA com a subunidade Est1 da telomerase, sugerindo que fosforilações podem ser importantes no papel desta proteína na modulação do tamanho do telômero (OAKLEY; PATRICK, 2010; SCHRAMKE et al., 2004).

Em células de humanos, foi demonstrado que RPA também possui a capacidade de modular a atividade da telomerase *in vitro* e ao mesmo tempo aumentar sua processividade (RUBTSOVA et al., 2009). O papel da RPA no auxílio da telomerase parece não estar restrito apenas ao seu recrutamento e atividade, pois foi demonstrado que o complexo RPA de humanos consegue desfazer estruturas G-quadruplex *in vitro* que poderiam bloquear o acesso da telomerase aos telômeros (QURECHI et al., 2012; RAY et al., 2014). De acordo com seu papel na manutenção do telômero, foi demonstrado que mutantes de RPA em células cancerígenas levam ao encurtamento telomérico (KOBAYASHE et al., 2010).

Apesar dos avanços no estudo da RPA com os telômeros, ainda não se sabe ao certo de que forma o complexo RPA consegue distinguir sua interação com os telômeros para manutenção telomérica tradicional na célula ou para sinalizar danos nessa região resultando numa resposta de *checkpoint*, com a consequente parada do ciclo celular. Provavelmente modificações pós traducionais como fosforilações podem ser um dos pontos chave para essa questão.



### Figura 1.5 - Envolvimento da proteína RPA em resposta a quebra de dupla fita de DNA e danos no telômero

Em A, quebra de fita dupla de DNA (*Double strand break – DSB*), em C e D, resposta a danos nos telômeros desencapados ou com danos físicos. Em ambos os casos, a proteína RPA está envolvida no recrutamento da maquinaria de reparo, sinalizando uma resposta de *checkpoint*. (LONGHESE, 2008).

## 1.5 *Trypanosoma cruzi* - Doença de chagas

Neste trabalho, utilizamos como modelo de estudo de telômeros o tripanossomatídeo *T. cruzi*, agente etiológico causador da doença de Chagas.

Os tripanossomatídeos são protozoários flagelados que pertencem à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Esta ordem é caracterizada pela presença do cinetoplasto, organela auto replicável que contém o DNA da mitocôndria (LOPES et al., 2010; WHO, 2010).

A Doença de Chagas aflige principalmente países da América Latina, porém um aumento substancial no número de casos na América do Norte, Europa e Ocidente tem sido reportado. Estima-se que aproximadamente 8 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo (WHO, 2010).

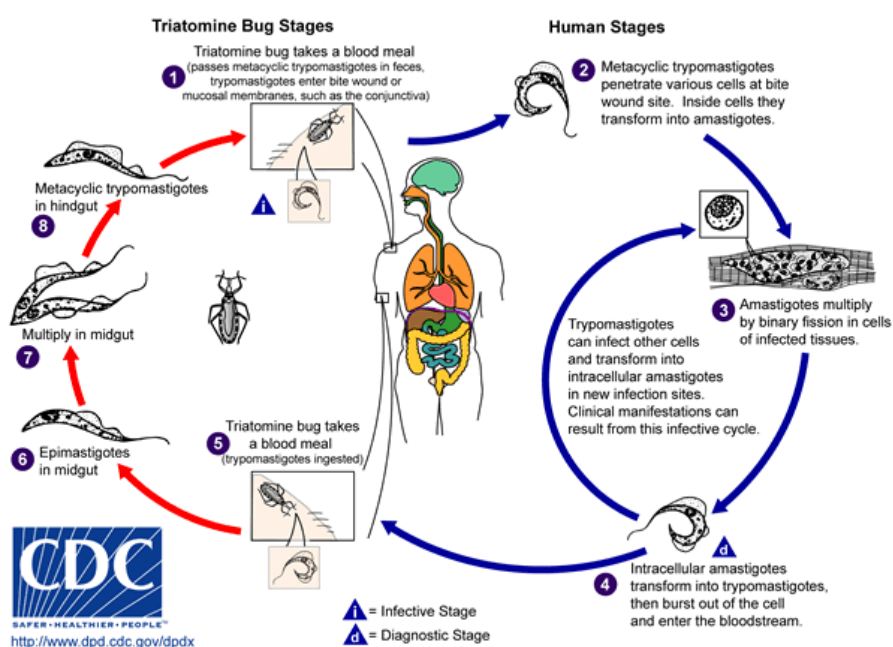
São mais de cem espécies responsáveis pela transmissão natural da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, intervindo diretamente na sua veiculação no ambiente domiciliar ou participando na manutenção da enzootia chagásica. Sua circulação ocorre entre insetos vetores (*Triatominae*, *Hemíptera*, *Reduviidae*), que são os hospedeiros invertebrados, e animais silvestres, animais domésticos e os seres humanos, os quais são os hospedeiros vertebrados. A sua presença no planeta remonta há mais de 150 milhões de anos, dotado de grande diversidade genética (WHO, 2010).

O *Trypanosoma cruzi* possui formas de vida não replicativas (tripomastigotas) e replicativas (epimastigotas e amastigotas). A infecção pelo *T. cruzi* começa com tripomastigotas metacíclicos sendo liberados nas fezes e urina do vetor. Essa forma de vida atinge a corrente sanguínea através de cortes na pele e na mucosa causados pela picada do triatomíneo, invadindo diferentes tipos de células do hospedeiro mamífero. Uma vez no citoplasma, tripomastigotas se diferenciam em amastigotas não-flagelados, que se replicam por divisão binária e diferenciam-se em tripomastigotas sanguícolas. Após lisar a célula hospedeira, os tripomastigotas podem circular na corrente sangüínea e infectar outros tecidos ou podem ser ingeridos por triatomíneos durante sua alimentação em um hospedeiro infectado e assim um novo ciclo se inicia (Figura 1.6). Nos últimos anos, uma série de trabalhos vêm reportando também o papel da infecção oral no ciclo de vida de *T. cruzi*, onde organismos vertebrados se infectam através da ingestão de barbeiros contaminados (YOSHIDA, 2008).

Os tripanossomatídeos possuem certas peculiaridades em sua biologia molecular. Esse protozoário apresenta 41 pares de cromossomos, e seu genoma possui um tamanho haplóide estimado de 60Mb e cerca de 12.000 genes. Pelo menos 50% do genoma de *T. cruzi* é sequência repetitiva (EL-SAYED et al., 2005). A maioria dos genes são organizados em arranjos policistrônicos, com RNAs mensageiros sofrendo principalmente *trans-splicing* (LIANG et al., 2003; MARTINEZ-CALVILLO et al., 2010). Além disso, os tripanossomatídeos possuem diferenças significativas na replicação e reparo do seu DNA em relação a outros eucariotos (EL-

SAYED et al., 2005; ELIAS; NARDELLI; SCHENKMAN; 2009; GODOY et al., 2009, PASSOS-SILVA et al., 2010).

A doença de Chagas causa cerca de 40.000 novas infecções por ano, não existem vacinas disponíveis e poucas drogas anti-parasitárias são eficientes no tratamento da fase aguda da doença (LOPES et al., 2010; OPS, 2006). O estudo dos telômeros desse parasita poderá facilitar o descobrimento de novas terapias e desenvolvimento de drogas antiparasitárias. Como os tripanosomas divergiram muito cedo da linhagem eucarionte, o conhecimento da biologia destes parasitas auxiliará sobretudo no entendimento do processo evolutivo da célula eucarionte.



**Figura 1.6 Ciclo de vida de *T. cruzi***  
(Center for Disease Control and Prevention, CDC, 2011).

## 1.6 Região subtelmérica e telômeros em tripanossomatídeos

Os telômeros de tripanossomatídeos ainda foram pouco explorados, porém a região adjacente ao telômero, chamada região subtelmérica, foi e vem sendo mostrada como importantíssima na regulação da expressão de proteínas de superfície.

A região subtelmérica de *T. brucei* possui diversos genes que codificam diversas glicoproteínas variantes de superfície (VSG), importantes na evasão do

sistema imune do hospedeiro. A variação antigênica requer a expressão de apenas um único VSG por vez pela RNA polymerase I. Desde a sua descoberta, o controle de expressão e silenciamento das VSGs tem sido alvo de muitos estudos e diversas proteínas parecem estar envolvidas nessa regulação (DRESSEN; LI; CROSS, 2007; GLOVER et al., 2013; PANDYA; SANDHU; LI, 2013; POVELONES et al., 2012). Em *T. cruzi*, a forma de vida tripomastigota expressa proteínas relacionadas com a invasão celular e evasão da resposta imune do hospedeiro. Os genes que codificam essas proteínas são divididos em grandes famílias, como por exemplo, a superfamília das Trans-Sialidase (TS) e a DGF-1 (*Dispersed gene family-1*). A região subtelomérica em *T. cruzi* é enriquecida de (pseudo)genes TS e DGF-1, além de genes de retrotransposons, sugerindo que essa região pode sofrer constantes recombinações e estar envolvida com a geração de novas variantes de proteínas de superfície (BARROS et al.; 2012; KIM et al., 2005).

Apesar da divergência evolutiva, os telômeros de tripanosomatídeos, incluindo *T. brucei* e *T. cruzi*, são constituídos pelas mesmas sequências encontradas em vertebrados 5'TTAGGG3' e são replicados pela telomerase (CANO et al., 1999; MUNÓZ; COLLINS, 2004). Em *T. cruzi*, a telomerase apresenta propriedades específicas e sua atividade foi verificada entre as diferentes formas de vida do parasito, não sendo identificada porém na forma de vida tripomastigota sanguícola (MUNÓZ; COLLINS, 2004).

Na região telomérica de tripanossomatídeos, algumas bases timina são substituídas por uma base nitrogenada peculiar chamada base J, descoberta em 1993 em *T. brucei*. A presença da base J não é exclusivamente telomérica, é encontrada também em outras sequências repetitivas, porém o telômero é a região de maior concentração dessa base peculiar. Estudos recentes demonstram que a base J está envolvida no controle do término da transcrição, e, além disso, que a ausência dessa base é fatal para *Leishmania* (GOMMERS-AMPT et al., 1993; VAN-LUENEN et al., 2012).

Pouco se sabe em relação a formação de estruturas secundárias nos telômeros de tripanossomatídeos, tendo sido apenas evidenciado a presença de t-loops em *T. brucei*, com um tamanho bem menor daqueles descritos em mamíferos (MUÑOZ-JORDAN et al., 2001).

Muito pouco se sabe sobre os telômeros de *T. cruzi*. Freitas-Junior et al. mostraram em 1999 que o tamanho dos telômeros nesse organismo varia entre



cepas diferentes, possuindo alta heterogeneidade, desde 500pb até 10kb. Porém ainda não há na literatura estudos que comparam o tamanho dos telômeros entre as diferentes formas de vida deste parasito.

As proteínas constitutivas dos telômeros de tripanossomatídeos ainda não foram completamente desvendadas. Até o momento, encontraram uma proteína homóloga a TRF-2 de mamíferos, descrita inicialmente em *T. brucei* e depois em *Leishmania amazonensis* responsável pela manutenção da dupla fita telomérica. Curiosamente, apesar da conservação de domínios, a TbTRF possui 41,5kDa e a LaTRF possui 82,5kDa. A ausência de TbTRF resulta em perda do *overhang* e parada no crescimento do *T. brucei* (DA SILVA et al., 2010; LI; ESPINAL; CROSS, 2005).

Foi identificada também uma proteína homóloga a proteína RAP-1 (interatora da TRF) que é importante para a manutenção da estabilidade telomérica. Além disso, essa proteína está envolvida com o silenciamento dos genes que codificam as VSGs (PANDYA et al., 2013; YANG et al., 2009).

Apesar da identificação destas proteínas, não foi identificado no genoma dos tripanossomatídeos nenhum homólogo de proteínas ligantes de simples fita telomérica conhecidas como Cdc13, POT1 ou TEBP (PAVANI et al., *in preparation*). Estudos em *Leishmania amazonensis* pelo grupo da Dra. Maria Isabel Cano encontraram inicialmente três proteínas que interagem com a simples fita telomérica rica em G *in vitro*, são elas LaRbp38, LaRPA-1 e uma terceira proteína não identificada (FERNÁNDEZ et al., 2004). Porém a função destas proteínas nos telômeros e na sua manutenção *in vivo* continua sendo uma questão em aberto.

## 1.7 RPA-1 em tripanossomatídeos

Existem pouquíssimos estudos em relação ao complexo RPA de tripanossomatídeos. A única proteína que foi estudada do complexo RPA nestes organismos é a subunidade RPA-1.

Apesar da conservação de domínios Obfold, a proteína RPA-1 de tripanossomatídeos possui diferenças em relação à RPA-1 de outros eucariotos. A principal diferença está na ausência do domínio 70N (figura 1.7, A), responsável pela interação do complexo RPA com proteínas da maquinaria de replicação, reparo e recombinação (NETO et al., 2007; XU et al., 2008).

Apesar da ausência deste domínio, estudos recentes vêm demonstrando uma possível relação da RPA-1 de *Leishmania* em resposta a danos no DNA. A ação do complexo 911 (Rad9, Hus1 e Rad1) descrita em eucariotos depende de sua interação com o complexo RPA (WU; SHELL; ZOU, 2005). Em *Leishmania major*, ensaios de imunofluorescência mostraram que após o tratamento com hidroxiuréia em células superexpressoras de LmHus1, ocorre uma redistribuição desta proteína no núcleo e pontos de co-localização com a LmRPA-1, sugerindo que as duas proteínas estão agindo em processos metabólicos similares no DNA. Apesar de encontrarem um aumento de LmRPA-1 ligada a cromatina em células tratadas com hidroxiuréia, os autores não evidenciaram redistribuição nuclear da LmRPA-1 em ensaios de imunofluorescência, e, apesar dos esforços com a utilização de diferentes protocolos, não conseguiram comprovar interação estável entre LmHus1 e LmRPA-1 (DAMASCENO; NUNES; TOSI, 2013).

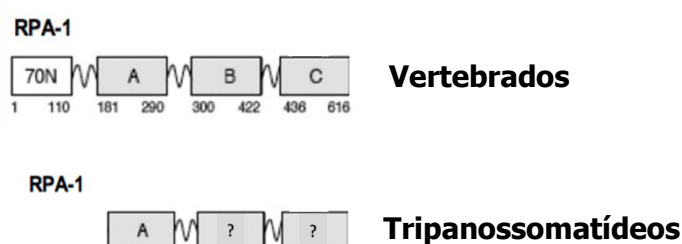
A quebra de dupla fita de DNA é induzida por fleomicina e dispara a via Tel1 (homóloga a ATM) em leveduras (NAKADA et al., 2003). Em diversos eucariotos, as quebras de dupla fita são reparadas por recombinação homóloga (HR) com a participação de RPA e RAD51 (STAUFER; CHAZIN, 2004). Em *Leishmania amazonensis*, após a indução de dano com fleomicina, há um aumento na quantidade de RAD51 no núcleo, porém não houve diferenças na quantidade de LaRPA-1. Porém, ensaios de imunoprecipitação realizados com Anti-LaRPA-1 demonstraram que esta proteína imunoprecipita RAD51 em células controle, e há um aumento da quantidade de RAD51 imunoprecipitada em células com dano induzido. Esse resultado sugere que a LaRPA-1 e RAD51 participam da resposta de recombinação homóloga (DA SILVEIRA et al., 2013).

Em relação aos telômeros, apenas a subunidade RPA-1 do trímero RPA foi identificada interagindo com a fita G do telômero *in vitro* em *Leishmania amazonensis* (FERNANDEZ et al., 2004). Anos depois, foi confirmada a interação da LaRPA-1 *in vivo* com os telômeros em *L. amazonensis*, porém a função desta proteína nos telômeros ainda não foi elucidada (NETO et al., 2007).

Já foi também analisado o papel de LaRAD51 e LaRPA-1 nos telômeros de *L. amazonensis* em resposta a danos com fleomicina. Curiosamente, foi observado através de ensaios de FISH/IF que após a indução de dano, há um aumento da quantidade de LaRPA-1 nos telômeros, não acompanhado de LaRAD51.

Adicionalmente, o anti-RAD51 não imunoprecipitou a sequência telomérica nas células controle e tratadas (DA SILVEIRA et al., 2013).

Através de ensaios de dicroísmo circular e modelagem, foi observado que a proteína LaRPA-1 interage com o DNA telomérico via domínio Obfold A, enquanto a RPA-1 de eucariotos superiores interage com o DNA pelos Obfolds A e B, devido a diferenças de resíduos de aminoácidos presentes no *linker* que conecta os dois domínios. O Obfold putativo RPA-1C, responsável pela interação da RPA-1 com os outros componentes do trímero em outros eucariotos, mostrou-se estruturalmente muito diferente na LaRPA-1 em comparação com a RPA-1C de eucariotos superiores. Além disso, dos 20 resíduos descritos importantes para a interação da RPA-1 com a RPA-2, apenas 2 são conservados, sugerindo que talvez o complexo RPA (RPA-1, RPA-2, RPA-3) nem seja formado em tripanossomatídeos, porém evidências experimentais ainda são necessárias para a confirmação desta hipótese (PAVANI, *in preparation*).



### Figura 1.7 - Estrutura da proteína RPA-1 de tripanossomatídeos

Em A, comparação da RPA-1 de vertebrados com a RPA-1 de tripanossomatídeos, que não possui o domínio 70N. Os pontos de interrogação indicam a presença de Obfolds que não possuem função descrita. Em B, esquema da interação do domínio 70N da proteína RPA-1 com a maquinaria de reparo via ATR (XU et al., 2008).

Todas as proteínas ligantes de simples fita teloméricas possuem similaridades estruturais com o complexo RPA ou seus componentes, sendo chamadas de RPA-like. Não foi encontrado nenhum homólogo destas proteínas no genoma de tripanossomatídeos e a proteína RPA-1 de tripanossomatídeos possui diversas peculiaridades em relação a RPA-1 de outros eucariotos. A somatória destas informações nos levou a hipotetizar que a proteína RPA-1 possa estar envolvida na proteção dos telômeros de tripanossomatídeos. Para investigar esta hipótese, este

trabalho visou verificar e caracterizar a interação RPA-1-telômero em *T. cruzi*, já que o complexo RPA neste parasito nunca foi estudado.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Caracterizar a interação da proteína TcRPA-1 com os telômeros em *Trypanosoma cruzi*

### 2.2 Objetivos Específicos

- Expressar e purificar a proteína rTcRPA-1
- Caracterizar a interação rTcRPA-1-telômero *in vitro* através de ensaios de EMSA
- Caracterizar a ligação TcRPA-1-telômero *in vivo* através de ensaios de FISH/IF e CHIP

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Epimastigotas

A forma epimastigota de *T. cruzi* (cepa Y) foi mantida em meio LIT complementado com soro bovino fetal 10 % e hemina 0,1 % (10 mg/mL dissolvida em 0,1 M de trietanolamina) a 28 °C (SCHENKMAN et al., 1994).

##### 3.1.1 Meio lit

Para 1 litro de meio LIT contendo 10% de soro fetal bovino foram dissolvidos em água Milli-Q os componentes conforme tabela abaixo.

**Tabela 3.1-** Componentes do meio LIT

<b>Componentes do meio</b>	<b>Quantidade</b>
<b>NaCl</b>	4g
<b>KCl</b>	0,4g
<b>Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	8,0 g
<b>Triptose</b>	5,0 g
<b>Infusão de Fígado</b>	5,0 g
<b>Hemina</b>	1 mL de solução 10mg/mL em trietanolamina 0,1M

O volume foi acertado para 900 mL de água Milli-Q e então autoclavado. Antes de sua utilização foram adicionados 100 mL de soro fetal bovino, 20 mL de glicose 20% e antibióticos (133mg de streptomina e 59mg de penicilina).

#### 3.2 Tripomastigota

Células LLC-MK2 (célula de rim de macaco rhesus - *Macaca mulatta*) foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium- Invitrogen) com 10% de soro fetal bovino à 37 °C na presença de 5% de CO<sub>2</sub>. Em garrafa de 150cm<sup>2</sup> foi

adicionado  $2 \times 10^5$  células LLC-MK2 em 40 mL de meio. Após dois dias estas células foram infectadas com  $10^7$  tripomastigotas e então mantidas à 37°C na presença de 5% de CO<sub>2</sub> por 7 dias, sendo que no quinto dia o meio de cultura foi trocado. Nos 5º e 6º dias, o sobrenadante de cultura foi coletado, centrifugado à 350 x g por 5 minutos e então incubados por no mínimo 1 hora à 37°C na presença de 5% de CO<sub>2</sub> para permitir que as formas tripomastigotas migrem para o sobrenadante. Os tripomastigotas foram coletados desprezando cerca de 5ml do fundo do tubo e então centrifugados por 10 minutos a 3220 x g.

### 3.3 Extração de DNA genômico dos parasitas

Para a extração de DNA genômico,  $10^8$  células foram lisadas em 150 µL de TELT (50 mM tris-HCl pH 8,0; 62,5 mM de EDTA; 4% TRITON X-100; 2,5 M LiCl<sub>2</sub>) e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Ao lisado foi adicionado 150 µL de fenol equilibrado com Tris 0,1 M pH 8,0 e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi centrifugado a 20.000 x g por 10 minutos e a fase aquosa superior foi coletada. A esta fase, foi adicionado 150 µL de clorofórmio e após homogeneização foi centrifugado a 20.000 x g por 10 minutos. A fase superior aquosa foi coletada e o DNA presente foi precipitado com o dobro de volume de etanol absoluto gelado. Após centrifugar a 20.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet de DNA foi lavado com 500 µL de etanol 70% gelado e novamente centrifugado por 5 minutos a 20.000 x g. O DNA foi ressuspensão em 100 µL de TE 1X (Tris-HCl 10 mM; 1 mM EDTA; pH 8,0) contendo 20 µg/mL de RNase A e incubado por 15 minutos a 37 °C.

### 3.4 Preparo de Bactérias Termocompetentes (*Escherichia coli*)

Uma colônia de *E. coli* DH5-α ou BL21 DE3 RP *códon plus* recém plaqueada em LB-ágar sem antibiótico ou na presença de 30 µg/mL de cloranfenicol, respectivamente, foi inoculada em 3 mL de LB líquido (com ou sem cloranfenicol, para BL21 DE3 RP *códon plus* e *E. coli* DH5-α, respectivamente) e incubada por 16 horas a 37 °C sob agitação de 180 rpm. Este pré-inóculo foi adicionado em 250 mL de LB (na presença ou ausência de cloranfenicol) e incubado sob as mesmas condições até atingir DO<sub>550</sub> entre 0,35 e 0,6. Estas bactérias foram incubadas no

gelo de 10 a 60 minutos, centrifugadas a 1.800 x g por 15 minutos sob refrigeração e o *pellet* foi ressuspense em 1/3 do volume original em FB (100mM KCl; 50 mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 10% glicerol (m/V); 10 mM acetato de potássio; pH 6,2) filtrado e gelado. Após incubação de 10 a 60 minutos no gelo as bactérias foram novamente centrifugadas e o *pellet* foi ressuspense em 1/12,5 do volume original em FB, em seguida foram feitas alíquotas de 200 µL e estas estocadas a -80 °C.

### 3.4.1 Transformação de Bactérias Competentes por Choque Térmico

Em tubo de transformação foi adicionado 200 µL de bactéria competente (*E. coli* DH5-α ou BL21 DE3 RP *códon plus*) juntamente com o DNA a ser transformado, 100 ng no caso de vetor fechado (com ou sem inserto) ou o volume total de uma reação de ligação vetor-inserto. O tubo foi incubado no gelo por 30 minutos e em seguida incubado por 1 minuto a 42 °C e colocado imediatamente no gelo por 5 minutos. Ao tubo foi adicionado 1 mL de LB líquido, seguindo-se com incubação a 37 °C sob agitação de 180 rpm por 1 hora. As bactérias cultivadas neste meio foram plaqueadas em LB-ágar contendo o antibiótico de seleção, incubadas em estufa a 37 °C por cerca de 16 horas.

## 3.5 Amplificação, clonagem e subclonagem da TcRPA-1

### 3.5.1 Amplificação por PCR e clonagem no vetor TOPO

O fragmento que codifica a proteína RPA-1 de *T. cruzi* (nº acesso do GenBank XM\_813926.1) foi amplificado por PCR utilizando-se DNA genômico do parasito e o par de iniciadores RPA-1-pET-F e RPA-1-pET-R (tabela 3.2). O fragmento foi clonado no vetor de clonagem pCR 2.1 – TOPO (Invitrogen), seguido de transformação em bactérias *Escherichia coli* DH5α.

**Tabela 3.2-** *Primers* utilizados para amplificação do fragmento TcRPA-1

Nome do primer	Sequencia
TcRPA-1-pET-F	5' GCTAGCCAACACCCGAGC 3'
TcRPA-1-pET-R	5' AAGCTTTTACAAATAGGCCTC 3'

Os nucleotídeos marcados em verde são os sítios de restrição para as enzimas de restrição.



### 3.5.2 PCR

Na amplificação por PCR foram utilizados 300 ng de DNA genômico de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), 2,5 mM de cloreto de magnésio, tampão contendo sulfato de amônia (tampão 10x de Taq polimerase – Kit Fermentas), 10 pmol de cada *primer*, 0,4 mM de dNTPs e 2U de Taq DNA polimerase (Fermentas).

O programa de amplificação foi feito com temperatura de 94 °C por 3 minutos para separação da dupla fita de DNA, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento 49,6°C (primers TcRPA-1-pET-F e TcRPA-1-pET-R) por 30 segundos e 72 °C por 30 segundo para a síntese da seqüência de nucleotídeos. Ao final dos 35 ciclos as amostras foram submetidas a 72 °C por 10 minutos.

### 3.5.3 Subclonagem do fragmento TcRPA-1 no vetor de expressão pET-28 (a+)

Para a subclonagem em vetor pET-28(a+), os DNAs plasmidiais e o vetor pET- 28(a+) foram digeridos com 2 enzimas de restrição, respectivamente *NheI* e *HindIII*. Para tal, 10ng de DNA plasmidial foram submetidos a dupla digestão com 1µl de cada enzima *NheI* e *HindIII* (Fermentas), ambas *Fast Digest*, utilizando-se 1 µL de tampão para 10 µL volume final. Essa reação foi incubada por 1 hora a 37°C. Após a digestão, a reação foi inativada a 60°C por 10 minutos e as amostras foram submetidas a um gel 1% de agarose e excisadas para purificação através do Kit *Sílica Bead DNA Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific). O mesmo procedimento foi feito para o vetor pET-28(a+) vazio.

Em seguida foram feitas as ligações entre o DNA digerido purificado e o vetor pET-28(a+), com a utilização de aproximadamente 78ng de DNA de cada inserto e 100ng do vetor, 1 µL de tampão e 1 µL de T4 DNA ligase (Invitrogen). A reação de ligação ficou a 4 °C *overnight*.

Os produtos de ligação foram transformados em bactérias competentes *E. coli* DH5α e plaqueados em LB sólido suplementado com 50 µg de Kanamicina, já que o vetor apresenta resistência a essa droga. Para verificar o sucesso da clonagem algumas colônias foram selecionadas e seus plasmídeos extraídos por lise alcalina. Os plasmídeos foram submetidos a dupla digestão com as mesmas enzimas e as

colônias contendo o inserto foram selecionadas. Posteriormente foi feita a extração do DNA plasmidial por lise alcalina das colônias selecionadas.

#### 3.5.4 Lise Alcalina

Diversas colônias de bactérias cultivadas em placa de LB-ágar foram semeadas em 2 mL de LB líquido contendo o antibiótico de seleção e incubadas por 16 horas a 37 °C sob agitação de 180 rpm. Estas bactérias foram centrifugadas por 5 minutos a 7000 x g e o pellet foi ressuspensão em 100 µL de solução I (0,9% de glicose [m/V]; 25 mM tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA). Em seguida foi adicionado 200µL de solução II (1% SDS; 0,2M NaOH) para a lise destas bactérias. Após incubar por 5 minutos a temperatura ambiente, 200 µL da solução III (1,88M acetato de potássio e 11,2% de ácido acético glacial) para neutralizar a reação de lise foram adicionados. O lisado foi incubado no gelo por 10 minutos e então centrifugado a 20000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi então recolhido e o DNA foi precipitado com 300 µL de isopropanol. Após nova centrifugação de 20000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 100 µL de etanol 70% gelado e centrifugado por 5 minutos à 20000 x g. O sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* de DNA, após secar, foi ressuspensão em 50 µL de água Milli-Q contendo 10 µg/mL de RNase A e incubado por 30 minutos a 37 °C.

### 3.6 Expressão das proteínas recombinantes rTcRPA-1

Após a subclonagem, os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar bactérias competentes *E. coli* DH5α. Esses transformantes foram plaqueados em Meio LB sólido, contendo 50µg/mL de Kanamicina. Para os ensaios de expressão, esses recombinantes foram utilizados para transformar bactérias competentes *E. coli* BL21 DE3 RP *códon plus*. Os transformantes foram plaqueadas em meio LB sólido contendo 50µg/mL de Kanamicina e 50µg/mL de cloranfenicol.

Foram realizados ensaios preliminares de expressão em pequena escala (2 mL de cultura), seguidos de eletroforese SDS/PAGE para observação do momento em que a bactéria expressa melhor a proteína recombinante (Mini-indução).

Para os ensaios em grande escala (500 mL de cultura), uma colônia transformante de cada mutante foi selecionada e pré-inoculada em 50 mL de meio

LB líquido suplementado com os antibióticos mencionados. Após 16h, os pré-inóculos foram depositados em 500 mL de meio LB líquido suplementado com antibióticos e incubados a 37 °C por aproximadamente 2 horas até atingir OD<sub>550</sub>, quando a expressão das proteínas foi induzida com 1 mM de IPTG e as culturas foram mantidas a 37 °C sob agitação por 24 horas de acordo com o observado na mini-indução.

Em seguida, as células foram submetidas a centrifugação a 10.000rpm por 15 minutos a 4 °C e o pellet foi armazenado no freezer -80 °C.

### 3.7 Purificação da proteína rTcRPA-1

O *pellet* proveniente da expressão em bactérias competentes foi ressuspensão em tampão de lise (50mM Tris-HCl pH8,0, 50mM NaCl, 10mM EDTA).

O DNA das amostras foi quebrado mecanicamente no gelo utilizando-se sonicação (3 repetições de 8 vezes de 15 segundos cada com intervalos de 30 segundos), e os extratos foram centrifugados a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C para a obtenção dos corpúsculos de inclusão.

Após a lise e lavagens dos *pellets*, estes foram ressuspensos em tampão (20 mM Glicina pH 10,0, 20 mM NaCl), e as proteínas foram desnaturadas na presença de 7M de ureia e 1mM β-mercaptoetanol.

Para a purificação da proteína rTcRPA-1, as soluções contendo a proteína desnaturada com uréia foram primeiramente submetidas a cromatografia por troca iônica fracionadas em coluna Q- sepharose previamente equilibrada com tampão A (20mM Glicina, 20mM NaCl, 7M Ureia, 71μL/L de β-mercaptoetanol, solução em pH 10) e as proteínas foram eluídas em gradiente constante de tampão B (20mM Glicina, 1M NaCl, 7M Ureia, 71 μL/L de β mercaptoetanol, solução em pH 10). Após a eluição da proteína nesta coluna, as frações que continham rTcRPA-1 foram visualizadas em gel 10% SDS-PAGE corado com *Coomassie* e os eluatos foram agrupados para serem fracionados em coluna HisTrap HP (GE Healthcare) carregada com NiSO<sub>4</sub> e equilibrada em Tampão de equilíbrio e lavagem (20 mM Tris-HCl; 0,5 M NaCl; 7 M Ureia; 71 μL/L de β mercaptoetanol, solução em pH 7,0). As frações contendo a proteína recombinante foram eluídas em concentração

constante de tampão de eluição (20 mM Tris-HCl, 0,5 M Imidazol; 0,5 M NaCl; 7 M Ureia; 71  $\mu\text{L/L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol, solução em pH 7,0).

As frações de rTcRPA-1 coletadas na coluna Histrap HP, foram dialisadas *overnight* em tampão de diálise (20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 7,0) na presença de heparina 1 $\mu\text{g/mL}$ . A heparina serve como um aditivo do tipo chaperona artificial, para permitir o perfeito renovelamento das proteínas (LIRA et al., 2007).

### 3.8 Produção do Anti-RPA-1

A produção de anticorpo policlonal foi realizada em colaboração com o Dr. Osvaldo Augusto Sant'Anna do laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan. A proteína recombinante rTcRPA-1 foi dialisada contra PBS1x para a realização das imunizações. Para a imunização foram utilizados camundongos geneticamente selecionados para alta resposta (linhagem HIII), de 2 a 3 meses de idade. A imunização foi feita com 2 $\mu\text{g}$  de rTcRPA-1 em *mesoporous sílica SBA-15* (MERCURI et al., 2006), via subcutânea em volume final de 200  $\mu\text{L}$ . Uma segunda dose foi realizada 90 dias depois do mesmo modo que a primeira dose. Amostras de sangue foram coletadas em diferentes períodos após as imunizações por meio do plexo venoso retro-orbital e o soro foi armazenado a -20 °C.

### 3.9 Ensaio de ELISA

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100ng de peptídeo/poço. Os peptídeos foram solubilizados em 50% metanol e então distribuídos nos 96 poços da placa. Estas placas foram mantidas abertas à temperatura ambiente *overnight* a fim de permitir total evaporação do metanol e fixação do peptídeo nos poços da placa.

As placas sensibilizadas com a proteína rTcRPA-1 foram então bloqueadas por pelo menos 2 horas com PBS/BSA 3% (100 $\mu\text{L}$ /poço) em câmara úmida à temperatura ambiente. Em seguida foi feita diluição seriada em PBS/BSA 3% anti TcRPA-1 e soro pré imune. Os anticorpos diluídos foram incubados nas placas previamente bloqueadas por 2 horas à temperatura ambiente em câmara úmida. Em seguida foram feitas 4 lavagens consecutivas com PBS/ Tween 20 0,1% e então as placas foram novamente incubadas por 2 horas à temperatura ambiente em câmara úmida com anticorpo secundário conjugado à peroxidase diluído 1:500 em PBS/BSA

3%. Após 4 lavagens com PBS/Tween 20 0,1% as placas foram incubadas com 50µL/poço de substrato (10µg/mL de 3',3',5',5' tetrametilbenzidine e 0,01% de peróxido de hidrogênio) por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi parada com 50µL de 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A leitura das placas foi feita com comprimento de onda de 450nm.

### 3.10 Western Blotting

As amostras de proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham Hybond™ ECL™ - GE HealthCare), sob 180V por 50 minutos. Para imunodeteção das proteínas recombinantes foi utilizado como anticorpo primário antiTcRPA-1. Como anticorpo secundário foi utilizado anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma). A membrana foi corada com solução de *Ponceau* para visualização das bandas proteicas. Posteriormente, a membrana foi lavada com água Milli-Q para retirada de excesso de corante e incubada em PBS (*phosphate buffered saline*) com 5% de leite em pó desnatado por 1 hora a temperatura ambiente para bloquear interações inespecíficas entre o anticorpo e membrana. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com PBS e incubada por 1 hora com o anticorpo primário (1:1000) em PSB/Tween-20 0,05%. O excesso de anticorpo na membrana foi removido por três lavagens por 10 minutos com PBS/Tween-20 0,05% e em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de mouse (1:1000) marcado com peroxidase por 1 hora. Novamente a membrana foi submetida à lavagens sucessivas com PBS/Tween-20 0,05% e então revelada utilizando o Kit de quimioluminescência (Millipore), seguindo as indicações do fabricante.

### 3.11 Dicroísmo Circular

O ensaio de Dicroísmo Circular (CD) foi realizado em colaboração com o grupo do Dr. Marcos Fontes, do Departamento de Física e Biofísica da UNESP - campus de Botucatu e foi executado utilizando-se o equipamento Jasco J-815 e o software *Spectra Manager™ II, CDPro program package* (SREERAMA;WOODY, 2000). Medidas foram feitas utilizando-se cubeta de quartzo de 0,5mm e os

seguintes parâmetros: *scanning speed* 100 nm/min; band width 2nm; step resolution 0.5nm, temperature 20°C.

O espectro corresponde à média de 20 acumulações de todos os espectros e foram coletados no intervalo de 190-260 nm. Todas as amostras foram analisadas na presença de fluxo de N<sub>2</sub> para que O<sub>2</sub> presente no ar não interferisse na leitura dos dados dentro do equipamento. A concentração de proteína utilizada foi de 260µg/mL para todas as medidas. As proteínas estavam armazenadas em tampão contendo 20mM cloreto de sódio e 20mM glicina. O tampão foi utilizado como branco.

Os espectros de CD foram analisados em termos de estrutura secundária utilizando-se o algoritmo Continnl disponível no programa de pacotes para deconvolução de curvas de CD, CDPro (SREERAMA;WOODY, 2000). Além disso, a quantidade de alfa hélices também foi estimada usando-se a equação proposta por Morrisset et al. em 1973.

A unidade utilizada para os espectros de CD foi a MRE (*Mean Residue Ellipticity/degrees cm<sup>2</sup>dmol<sup>-1</sup>residue<sup>-1</sup>*) que é uma das mais utilizadas.

### 3.12 Extrato diferencial

O extrato diferencial foi obtido a partir de 1x10<sup>8</sup> células. Os parasitas, obtidos por centrifugação a 6000 rpm por 3 minutos, foram lavados por 2 vezes com PBS 1X nas mesmas condições de centrifugação. O sedimento foi ressuspensão em 100 µL de tampão de lise CSK (10 mM de Tris-HCl pH 7,4; 100 mM de NaCl; 300 mM de Sacarose; 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 50mM de fluoreto de sódio; 1 mM de ortovanadato de sódio; 0,1 % de triton; 0,1 mM de PMSF e inibidores de proteases) e colocado no gelo por 10 minutos sob agitação. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 6000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante resultante foi separado em um novo tubo coletor, fração denominada “fração solúvel 1”. O precipitado foi novamente ressuspensão com 100 µL de CSK e incubado novamente sob agitação por 10 minutos a 4 °C, seguido de centrifugação a 6000 rpm por 2 minutos, este novo sobrenadante foi chamado de “fração solúvel 2”. O sedimento resultante após a lise com CSK foi ressuspensão em 100 µL de uma solução de DNase (50U de enzima DNase, 10 µL tampão da enzima, completando-se para um volume de 100ul com H<sub>2</sub>O Milli-Q) e incubado a 37 °C por 30 minutos. Após esse tempo a amostra foi

centrifugada a 6000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante transferido a um tubo novo, nomeando esta fração de “DNAse 1”. O precipitado foi novamente ressuspenso em 100 µL de solução de DNAse e incubado a 37 °C por 30 minutos. Finalmente, o material foi centrifugado nas mesmas condições acima e o sobrenadante assim obtido foi separado num novo tubo coletor, nomeando esta fração de “DNAse 2”. Uma alíquota de 20 µL de cada fração foi misturada com 20 µL de tampão de amostra 2X, fervida e submetida a eletroforese SDS-PAGE. Os géis foram corados com *Coomassie blue* ou transferidos para membrana de nylon e utilizados para ensaios de *Western Blotting*.

### **3.13 Ensaios de EMSA**

#### **3.13.1 Obtenção dos oligonucleotídeos marcados:**

Para a obtenção dos oligonucleotídeos marcados foi usado 3,85 pmol/µL de oligonucleotídeo, misturado a 4 µL tampão de marcação (*kit Dig Gel Shift Roche*); 4 µL de CoCl<sub>2</sub>; 1 µL de solução DIG-11-ddUTP e 1 µL de terminal transferase. Essa mistura foi incubada por 15 minutos a 37°C, em seguida a reação foi parada com 2µL de EDTA 0,2M pH8,0. Para deixar a concentração do oligo marcado a 4ng/µl, 3µL de água bidestilada foi adicionada a mistura.

Após a marcação dos oligonucleotídeos, foi observada a eficiência da marcação mediante ensaio de diluição seriada (1:10, 1:100, 1:1000) da solução estoque. Sobre uma membrana de nylon foi colocada 1 µL de cada diluição. Em seguida foi feito um *cross-linking* com luz ultravioleta (UV) por 15 minutos. Após esse período, a membrana foi colocada em solução 10X de SSC (1,5 M NaCl; 0,15 M de citrato de sódio a um pH de 7,0) e mantida em luz UV por mais 5 minutos. Para a detecção da quimioluminescência, a membrana foi revelada com o *kit Dig Gel Shift* (Roche), segundo as instruções do fabricante.

#### **3.13.2 Obtenção dos oligonucleotídeos de dupla fita**

Para a obtenção da dupla fita de oligonucleotídeos marcados, os dois oligos complementares foram misturados numa razão molar de 1:1 com o tampão TEN (10 mM Tris, 1 mM EDTA e 100 mM NaCl pH 8,0) e incubados por 10 minutos a 95 °C.

Em seguida, o tubo foi colocado em temperatura ambiente para esfriar lentamente e formar a dupla fita, que foi posteriormente marcada seguindo o procedimento acima.

### 3.13.3 Interação DNA/proteína

Para a interação DNA/proteína, os oligonucleotídeos de telômero marcados na etapa anterior e a proteína recombinante TcRPA-1 numa concentração de 1 µg. Este ensaio foi realizado com o *kit Dig Gel Shift (Roche®)*, seguindo as instruções do fabricante.

Os reagentes foram misturados no gelo, conforme a tabela 3.3

**Tabela 3.3-** Reagentes para ensaio DNA/proteína

	Tubo 1 (controle)	Tubo 2 (TcRPA-1)
<i>Binding buffer</i> (µL)	4	4
<i>Poly[d(I-C)]</i> (µL)	1	1
<i>Poly L-lysine</i> (µL)	1	1
<i>Oligo labeled</i> (pmol)	1,55	1,55
<i>Proteína TcRPA-1</i>	--	1 µg

Os tubos foram completados com água para um volume final de 20 µL e em seguida foram deixados em temperatura ambiente por 15 minutos, e depois colocados no gelo. Foi adicionado à amostra 5µl de Bromofenol azul, de acordo com as instruções do *kit*.

As amostras foram aplicadas num gel de acrilamida: 250 µL de tampão TBE 10X (890 mM de Tris-HCl; 890 mM de ácido bórico; 20 mM de EDTA, pH 8,0); 2 mL de acrilamida/bisacrilamida 27,5:1; 16 µL de TEMED® e 200 µL de PSA (persulfato de amônio) e a mistura foi completada com água bidestilada para um volume final de 10 mL. Usou-se como tampão de corrida TBE 0,25X, a 80 V por 55 minutos. Depois da corrida as amostras foram transferidas para uma membrana de nylon (Hybond N+), utilizando como tampão de transferência TBE 0,25X, a 400 mA por 30 minutos. Em seguida, a membrana foi fixada com luz ultravioleta (UV) por 15 minutos. Após esse tempo a membrana foi colocada em solução SSC 10X e mantida em luz UV por mais 5 minutos. No dia seguinte, a membrana foi posteriormente lavada, bloqueada e incubada com anticorpo *anti-digoxigenin-AP* (as soluções e o anticorpo são



provenientes do *kit*). Para a detecção da quimioluminescência, a membrana foi revelada com o *kit Dig Gel Shift (Roche)*, segundo as instruções do fabricante.

### 3.13.4 Ensaios de Competição da interação DNA/proteína

Para testar a especificidade da interação DNA/proteína foi realizada competição com oligonucleotídeos frios (não marcados). Para os ensaios de competição, foram utilizados oligonucleotídeo com a sequência da fita G do telômero marcado, sequências competidoras não marcadas (Tabela 3.5) e a proteína recombinante TcRPA-1. Este ensaio foi realizado com o *kit Dig Gel Shift*, seguindo as instruções do fabricante.

A mistura dos reagentes foi feita em gelo, de acordo com a tabela 3.4:

**Tabela 3.4-** Reagentes e concentração de competidores utilizados nas competições em ensaios de EMSA

	Tubo 1 (controle)	Tubo 2 (TcRPA-1)	Tubo 3 (TcRPA-1 + competidor 1X)	Tubo 4 (TcRPA-1 + competidor 100X)
<i>Binding buffer</i> (µL)	4	4	4	4
<i>Poly[d(I-C)]</i> (µL)	1	1	1	1
<i>Poly L-lysine</i> (µL)	1	1	1	1
<i>Oligo labeled</i> (pmol)	1	1	0,155	15,5
<i>Oligo unlabeled</i> (pmol)	--	--	0,155	15,5
<i>Proteína. TcRPA-1</i> (µg)	--	1	1	1

Os tubos foram completados com água para um volume final de 20 µL e em seguida foram deixados no gelo por 15 minutos. As amostras foram corridas num gel de acrilamida, depois foram transferidas para uma membrana de nylon e detectados por quimioluminescência da mesma forma que o descrito na etapa anterior (ver

3.12.3). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados para os ensaios EMSA estão presentes na tabela 3.5:

**Tabela 3.5-** Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de EMSA

Oligonucleotídeos	Sequência
Sequência telomérica*	5' TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG3'
Região subtelomérica*	5' GCGACCACTGGAGGATGAAGGAATCCTTG3'
Inespecífico*	5' GCTAGCTCACTCCCGTGAAACTCAATAATG3'
Sequência repetitiva	5' GAATTCTAGTACTAGTACTAGTACTAGTACTAGTACTAGTACGAATTC 3'

\* Sequências presentes no genoma de *T. cruzi*

### 3.14 Imunofluorescência

Para realização de lâminas em ensaios de imunofluorescência,  $10^7$  parasitas em cultura exponencial foram centrifugados (800x g por 3 minutos), lavados com PBS1X, centrifugados e o *pellet* foi ressuspenso em 1mL de PBS1x. Aproximadamente 50  $\mu$ L destes parasitas foram colocados em cada poço de lâmina contendo 8 poços (Tekdon Inc.) e foram deixados em repouso por 5 minutos para que os parasitas aderissem ao vidro da lâmina. Estes foram então fixados por 20 minutos com paraformaldeído 2% e então permeabilizados com 0,1% de TRITON X-100 em PBS1X por 10 minutos. As células foram bloqueadas com PBS/BSA1% por 30 minutos e em seguida incubadas por 1 hora com anticorpo primário anti-RPA-1 diluído 1:100 em PBS/BSA1%. Após 5 lavagens sucessivas com PBS1x, as células foram incubadas por 1h com anticorpo secundário anti-coelho conjugado à Alexa 555 diluído 1:500 em PBS/BSA1% acrescido de DAPI 1:1000 (estoque 5 mg/mL). Após 5 lavagens sucessivas com PBS1x, a lâmina foi montada com *Vecta Shield* (Vector). Alternativamente, antes da fixação os parasitas foram mantidos por 10 minutos na presença de tampão CSK.

As imagens foram seriadas em fatias (0,2- $\mu$ M série-Z) e coletadas em uma objetiva de 100X 1,35NA utilizando o software Cell R em microscópio motorizado *Olympus IX81*. As imagens foram processadas por deconvolução utilizando o programa *Autoquant X 2.1*.

### 3.15 Imunoprecipitação de cromatina

#### 3.15.1 Obtenção da Cromatina

Para ensaio de imunoprecipitação de cromatina foram utilizadas  $10^9$  células da forma epimastigota de *T. cruzi* de cultura em fase de crescimento logarítmico e forma tripomastigota. Estas células foram centrifugadas a 3000 x g por 10 minutos, lavadas uma vez com o mesmo volume de PBS 1X e ressuspensas no mesmo volume inicial de PBS1X. As células foram então fixadas com a adição de formaldeído para concentração final de 1% e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente sob agitação. A reação de fixação foi interrompida pela adição de 125 mM de glicina (concentração final) por 5 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, as células fixadas foram centrifugadas a 3000 x g por 15 minutos a 10 °C, lavadas uma vez em PBS1X/125 mM glicina gelado seguida de outras duas lavagens com apenas PBS1X gelado. Após nova centrifugação de 15 minutos a 3000 x g a 10°C, o *pellet* foi ressuspensão em 2 mL de tampão de lise para ChIP (50 mM HEPES pH7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% de deoxicolato de sódio; 1% NP-40; 1 mM PMSF e coquetel de inibidores de protease - Roche) e sonificado por 8 vezes de 10 segundos cada, com intervalos de 1 minuto em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a 20000 x g por 1 hora a 4 °C e o sobrenadante foi coletado.

Para controle, 10% deste sobrenadante foi coletado e o DNA extraído com fenol/clorofórmio e os demais 90% foram utilizados para a imunoprecipitação.

#### 3.15.2 Imunoprecipitação da Cromatina

A imunoprecipitação foi realizada com a adição do anticorpo anti-RPA-1 na diluição de 1:1000, incubando *overnight* a 4°C sob agitação. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 20000 x g por 15 minutos a 4°C e colocada em novo tubo contendo 30 µL de resina de proteína G sepharose por 2 horas a 4°C sob agitação (a proteína G sepharose foi previamente tratada com BSA na concentração final de 5 mg/mL por 5 minutos no gelo e depois centrifugada a 3800 x g por 1 minuto). Após

esse tempo a amostra foi lavada por 2 vezes com 1 mL de tampão de lise para ChIP (ver 3.14.1), 1 mL de tampão de lavagem de ChIP (10 mM de Tris-HCl pH8,0; 250 mM de LiCl; 0,5% de dioxicolato sódico; 1 mM de EDTA e 0,5% de NP-40) e por 2 vezes com TE (10 mM de Tris-HCl pH8,0 e 1 mM de EDTA).

Para reverter a ligação proteína-DNA, a cromatina imunoprecipitada foi eluída adicionando 250 µL de tampão de eluição (50 mM de Tris-HCl pH 8; 10 mM de EDTA e 1% de SDS) e incubada a 65 °C por 16 horas sob agitação de 400 rpm.

Após centrifugação o sobrenadante foi coletado e o DNA obtido foi então purificado com fenol/clorofórmio.

### 3.15.3 Purificação do DNA com fenol/clorofórmio

À amostra contendo DNA foi adicionado TE até completar um volume de 300 µL. Foi acrescentado 300 µL de fenol a este volume e agitado usando vortex. A amostra obtida foi centrifugada a 20000 x g por 15 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante aquoso foi recolhido em um tubo novo. A este sobrenadante foi adicionado 300 µL de clorofórmio e, após homogeneização, foi novamente centrifugado. A fase aquosa superior foi coletada e foi adicionado 10% do volume obtido de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 3,5 volumes de etanol absoluto gelado. O material foi incubado por 2 horas no freezer -80 °C. Após esse tempo, a amostra foi centrifugada a 20000 x g por 10 minutos e o *pellet* foi lavado com etanol 70% e novamente centrifugado. Após essa etapa, a amostra foi secada a 65 °C por 10 minutos e ressuspenso em 20 µL de TE.

### 3.15.4 Hibridização com Sondas de DNA

Em uma membrana de nylon (Hybond N+) foi gotejado o DNA controle (*input*) e o DNA obtido da imunoprecipitação (previamente desnaturado por 5 minutos a 95 °C, seguido de incubação imediata de 5 minutos no gelo). Em seguida foi feito o *crosslink* do DNA com a membrana, expondo-a por 15 minutos à luz UV do transiluminador de captura de imagens de géis de agarose. Para detecção de sequências específicas foram utilizadas sondas de DNA marcadas com fosfatase alcalina. A sonda utilizada para hibridização possui a sequência 5XAATCCC, que reconhece a sequência telomérica rica em G. A marcação das sondas, bloqueio,

hibridização e lavagem da membrana foram feitas utilizando o *kit Armesham AlkPhos Direct Labelling (GE Healthcare Life Science)* e a detecção foi feita utilizando substrato quimioluminescente para fosfatase alcalina *CDP-Star Detection Reagent (GE Healthcare Life Science)*, conforme instruções do fabricante.

Em seguida filmes radiográficos (Kodak) foram expostos às membranas por cerca de 16 horas, então revelados e fixados nas soluções reveladoras e fixadoras (Kodak), respectivamente.

### 3.16 Imunofluorescência acoplada a FISH

Primeiramente as lâminas foram incubadas *overnight* em uma solução de HCl fumegante diluído em água, na proporção 1:2. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com etanol 70% por 1 hora.

Após a limpeza das lâminas, estas foram tratadas com poli lisina para auxílio da fixação dos parasitas e foi colado selo para hibridização *in situ Frame Seal* (Bio-Rad). Aproximadamente  $10^7$  parasitas foram centrifugados (800x g por 3 minutos), lavados com PBS1X, centrifugados e o *pellet* foi ressuspensão em 1mL de PBS1X. Deste 1mL em PBS1X, 80uL de parasitos foram colocados em cada lâmina e incubados por 5 minutos para adesão à lâmina. Os parasitos foram então fixados com paraformaldeído 4% e permeabilizados com TRITON X-100 0,1% em PBS1X por 10 minutos.

Após a permeabilização, os parasitos foram lavados três vezes com PBS1X e incubados por 1 hora com anti-RPA-1 diluído 1:100 em PBS/BSA1%. Após 4 lavagens sucessivas com PBS1x, as células foram incubadas por 45 minutos com anticorpo secundário anti-coelho conjugado à Alexa 555 diluído 1:500 em PBS/BSA1% acrescido de DAPI 1:1000(estoque 5 mg/mL). Realizado o ensaio de imunofluorescência, os parasitos foram pós fixados com formaldeído 4% gelado por 20 minutos e lavados 3X com PBS1X.

Para o início do FISH, as células foram desidratadas mergulhando-se a lâmina por 2 minutos em soluções de etanol 70%, etanol 80% e etanol 90% respectivamente e colocadas para secar. Após a secagem, foi adicionado 10 uL de sonda Fita G telomérica (5'TTAGGGTTA3' FITC PNA) em tampão de hibridização (70% Formamida, 20 mM Tris-HCl, pH 7,0 e 1% BSA) e o *frame-seal* foi selado. Incubou-se a lâmina a 95 °C por 5 minutos. Após esse passo, sem ter deixado a

lâmina esfriar, esta foi incubada por 37 °C *overnight*. No dia seguinte, o *frame-seal* foi retirado e a lâmina foi lavada a 60 °C com a solução *Wash Solution* do *kit* por 5 minutos. Após a lavagem, as lâminas foram novamente desidratadas por 2 minutos nas soluções de etanol 70%, 80% e 90% respectivamente e colocadas para secar. Após a secagem, a lâmina foi montada com *Vecta-Shield* (Vector). Para aquisição das imagens, estas foram seriadas em fatias (0,2- $\mu$ M série-Z) e coletadas em uma objetiva de 100X 1,35NA utilizando o *software Cell R* em microscópio motorizado Olympus IX81. As imagens foram processadas por deconvolução utilizando o programa *Autoquant X 2.1*.

### 3.17 Ensaio de incorporação de EdU acoplado a imunofluorescência

Para os ensaios de EdU acoplados a imunofluorescência, utilizamos o kit *Click-iT® EdU Imaging Kit* da Invitrogen, seguindo o protocolo do fabricante com pequenas modificações quando necessário.

Formas epimastigotas de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento foram incubados por 20 minutos em meio LIT com 100  $\mu$ M de EdU. Passado esse tempo, os parasitos foram centrifugados (800x g por 3 minutos), lavados com PBS1x, centrifugados e o *pellet* foi ressuspenso em 1mL de PBS1X. 50 $\mu$ L destes parasitas foram colocados em cada poço utilizado de lâmina contendo 8 poços (Tekdon Inc.) e foram deixados em repouso por 5 minutos para que os parasitos aderissem ao vidro da lâmina. Estes foram então tratados com o tampão CSK por 10 minutos, lavados uma vez com o mesmo tampão e uma vez com PBS/BSA 3% e então fixados por 15 minutos com formaldeído 3,7% em PBS1X, seguido de 3 lavagens com PBS/BSA 3%. Posteriormente, os parasitos foram incubados por 30 minutos com a solução *Click-iT® reaction cocktail* e lavados por 3 vezes com PBS/BSA 3%.

Após os procedimentos citados, seguimos com o ensaio de imunofluorescência, como descrito anteriormente, porém iniciando o protocolo no passo de incubação do anticorpo primário anti-RPA-1, uma vez que os parasitos já estão fixados e permeabilizados.

Após a montagem da lâmina com *Vecta-Shield* (Vector), as imagens foram seriadas em fatias (0,2- $\mu$ M série-Z) e coletadas em uma objetiva de 100X 1,35NA utilizando o *software Cell R* em microscópio motorizado Olympus IX81. As imagens foram processadas por deconvolução utilizando o programa *Autoquant X 2.1*.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise *in silico* e PCR do fragmento que codifica TcRPA-1

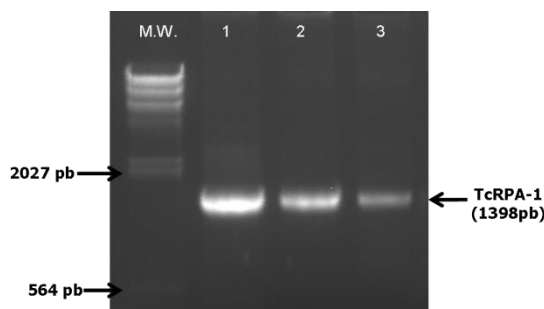
Iniciamos este trabalho com a amplificação por PCR do fragmento de DNA que codifica a proteína TcRPA-1, uma proteína de aproximadamente 51kDa (XM\_813926.1). Para checar a semelhança da proteína de *T. cruzi* com a de outros tripanossomatídeos, escolhemos a proteína LaRPA-1 de *Leishmania amazonensis* (AAR84278.1) De acordo com o alinhamento, a proteína TcRPA-1 possui identidade de 73% em relação a proteína LaRPA-1 de *L. amazonensis*, o que mostra alto grau de conservação entre as duas proteínas (Figura 4.1). Quando comparamos com a RPA-1 de *Homo sapiens* (NP\_002936.1), a identidade cai para 35% (dados não mostrados).

		1	50
TcRPA-1	(1)	MQHPSNQIQIPIDSLTPFLGGKWWIRARVTDKSDVVRTWNKPTSQGKLFSS	
LaRPA-1	(1)	MQQPGSHQIQIPIDSLTPFLGGKWWIRARVTDKTDVVRTWNKPTSQGKLFSS	
		51	100
TcRPA-1	(51)	TLIDESASIRATVFNDVAVDLFNPLIVNGQVYYLSGGQVKNANRKFNSVNN	
LaRPA-1	(51)	TLIDESAAIRATVFNDVAVDTFEPLIVNGQVYYFSGGQVKNANRRFSVNN	
		101	150
TcRPA-1	(101)	DYELTFDSSSQISLAR-DPSSATIPLQRYNFLPIAAILKQREVGS�VDVLA	
LaRPA-1	(101)	DYELTFDRSSEIMLARQDTSSTAALPMQRYNFVPIELLKQREVGS�VDVLA	
		151	200
TcRPA-1	(150)	VVLSVEELSSITQKSTGRELIKRNKVGDIITAAVEVTLWNDQAKWAYSP	
LaRPA-1	(151)	VVLKVDDEVSSITQKSTGRELVKRNKMGDMITAAVEVTFWNDEAKAWCYPV	
		201	250
TcRPA-1	(200)	GTVLAMRQLKVGSGFDGVTLSATFQSAFDVNP-NIPDVKKLAEWYISTGGR	
LaRPA-1	(201)	GTVVALRQLKVGSGFHGVPFSSTYQTKIDINPTDLPDVKKLATWYVTTGGA	
		251	300
TcRPA-1	(249)	DVSSLSLGVGAGNAGGENYRGRKYFDDISAEGLRGPKADFDVRCVP	
LaRPA-1	(251)	NVMSLSSQGLGASGAGGESDRGRKYLDEIQSDGIGRGLKPEYVDVRCVP	
		301	350
TcRPA-1	(299)	VYLKQDAQWYDACPQCENKVTLEGAQGERYRCEKCDRQVVPTQRYLVSISQ	
LaRPA-1	(301)	IYFKQDAQWYDACPTEENKVTLEGAQGERYRCEKCDKTVTPTQRYLVSISQ	
		351	400
TcRPA-1	(349)	ASDNVSQKWLTLFNEAGVEFFGMPATELKKQOEADPMFVTKLAQLRMNRP	
LaRPA-1	(351)	VLDNVSQAWLTLFNEAGIEFFGMEAAELKRRAQEDPLYIAKLAQGRMNRP	
		401	450
TcRPA-1	(399)	VQMRLRVKEESSSSAAGGEESDRVRLTVMRLNEFMPLDTVSEEKROAMAA	
LaRPA-1	(401)	VVMRLRVKEETSSNAMTGEESDRLRMSVVRISSEFMPIAGTSEETRRRLAQ	
		451	467
TcRPA-1	(449)	QLKTECEEMVRCIEAYL	
LaRPA-1	(451)	NLRTECEELLRLIEAYV	

**Figura 4.1- Alinhamento de seqüências das proteínas TcRPA-1 e LaRPA-1**

Em amarelo, aminoácidos idênticos entre as duas proteínas. Em verde, grupos de aminoácidos com características semelhantes.

Para a amplificação genômica do fragmento de DNA que codifica a TcRPA-1 (Figura 4.2), foi realizado ensaio de PCR, utilizando-se os iniciadores descritos na tabela 3.2. Visando a máxima eficiência para amplificação do fragmento, foi realizado um gradiente de temperatura na fase de anelamento do PCR. A amplificação possui maior rendimento em 49,6°C (Figura 4.2, linha 1).



#### Figura 4.2- Amplificação genômica do fragmento da TcRPA-1

Gel de agarose 1% em 0,5X TAE corado com brometo de etídeo, mostrando a amplificação por PCR do fragmento que codifica a TcRPA-1. Nas linhas 1, 2 e 3 foram testadas diferentes temperaturas de anelamento (49,6°C, 51°C e 54,6°C respectivamente). M.W. representa o marcador de peso molecular: Lambda DNA/HindIII.

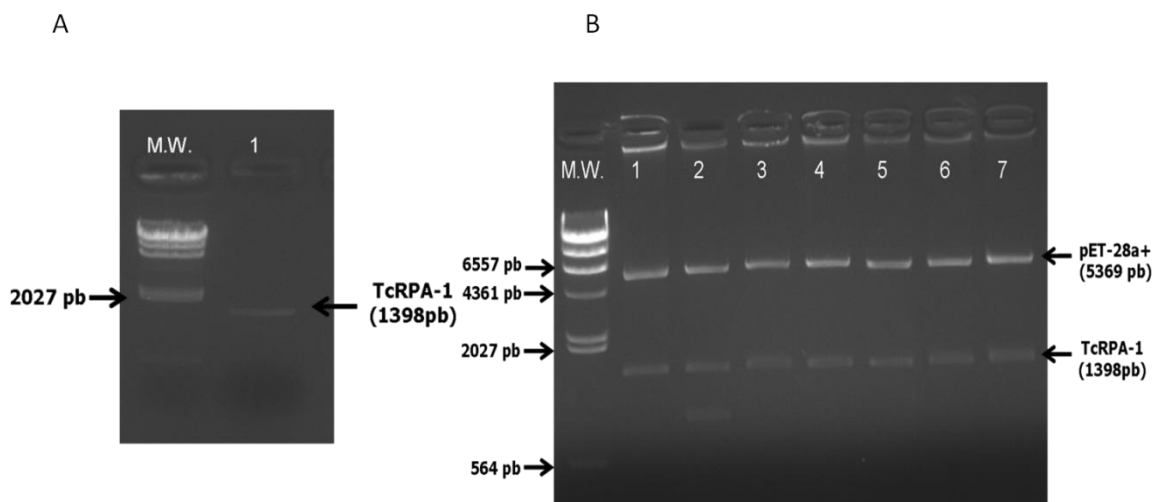
#### 4.2 Clonagem do fragmento da TcRPA-1 no vetor TOPO e subclonagem no vetor de expressão pET-28(a+)

De posse dos produtos amplificados obtidos por PCR, estes foram purificados e, em seguida, clonados em vetor de clonagem pCR 2.1 –TOPO. A construção TcRPA-1 + TOPO foi digerida com as enzimas de restrição *NheI* e *HindIII* e a banda correspondente ao fragmento da TcRPA-1 foi purificado (Figura 4.3, A).

A subclonagem do gene TcRPA-1 no vetor de expressão bacteriano pET-28(a+) permite a obtenção de proteína recombinante contendo uma cauda de 6X-Histidina na extremidade N-terminal, a qual facilita o processo de purificação dessas proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade em colunas de níquel. Para a realização da subclonagem, o vetor pET-28(a+) foi previamente digerido com as enzimas de restrição *NheI* e *HindIII*. Após a digestão, foi feita ligação do inserto no vetor. A construção TcRPA-1+ pET-28(a+) foi obtida com sucesso e submetida a digestão com as mesmas enzimas para confirmar a subclonagem (Figura 4.3, B). O plasmídeo com o inserto de interesse foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$ . Uma vez obtidos os clones recombinantes, extrações plasmidiais foram



realizadas e os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar bactérias competentes *E. coli* BL21 DE3 *codon plus*, adequada para expressão heteróloga em sistema bacteriano.



#### Figura 4.3- Purificação do fragmento TcRPA-1 e digestão da construção TcRPA-1 + pET-28(a+)

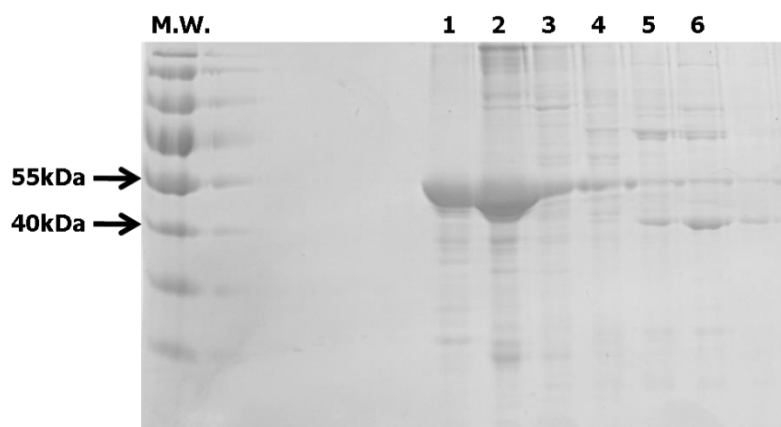
Em A, O fragmento TcRPA-1 obtido da digestão da construção TcRPA+TOPO foi purificado e submetido a gel de agarose. Em B, digestão da construção TcRPA-1+pET28(a+) com enzimas de restrição *NheI* e *HindIII* (linhas 1 a 7). M.W. representa o marcador de peso molecular: Lambda DNA/*HindIII*. Géis de agarose 1% em 0,5X TAE corado com brometo de etídio.

### 4.3 Expressão e purificação da proteína rTcRPA-1

Foram realizados ensaios preliminares de expressão em pequena escala (2 mL de cultura), com a presença de 1mM de IPTG, para observação do momento em que a bactéria expressa as proteínas recombinantes em maior quantidade (Mini-indução). A proteína rTcRPA-1 é expressa com 24 horas de indução e é encontrada na fração insolúvel do extrato bacteriano. Após a indução, as células bacterianas são submetidas ao tratamento com tampão de lise e sonicação, acarretando no rompimento de sua parede e membrana, expondo assim seu produto intracelular e a proteína recombinante de interesse. Por se encontrar na fração insolúvel do extrato, é necessária ressolubilização de proteínas utilizando-se uréia.

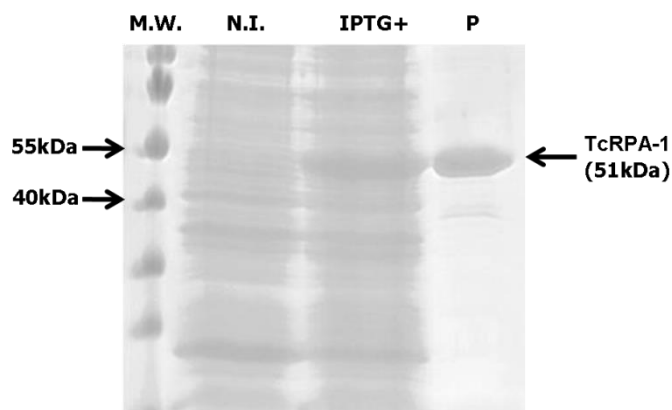
A cromatografia da proteína rTcRPA-1 foi realizada em duas etapas: cromatografia por troca iônica, seguida de cromatografia por afinidade.

A proteína TcRPA-1 possui ponto isoelétrico teórico de 6,7. Para o primeiro ensaio de cromatografia, foi utilizado tampão em pH 10,0, condição onde a proteína rTcRPA-1 possui carga líquida negativa. O extrato bacteriano foi submetido a coluna de troca aniônica *Q-Sepharose* (*GE Healthcare Lifescience*) (Figura 4.4). Foi observada um proteína de massa molecular esperada (51 kDa) nas frações 1 e 2. Estes eluatos da coluna de troca aniônica contendo a proteína de interesse foram posteriormente submetidos a coluna de afinidade *Histrap HP* (*GE Healthcare Lifescience*). A proteína recombinante rTcRPA-1 possui uma cauda de 6XHistidina no N-terminal, a qual tem forte afinidade pelo níquel, presente na coluna de afinidade. Para confirmar a purificação, o extrato bacteriano não induzido, induzido e o eluato da coluna de afinidade foram aplicados em um gel SDS PAGE 10% (Figura 4.5). Pudemos observar uma banda majoritária de 51 kDa na fração eluída, indicando que a proteína RPA-1 foi purificada do extrato bacteriano. Para o correto *refolding* da proteína TcRPA-1, foi adicionado 1ug/mL de heparina nos eluatos da coluna de afinidade, que serve como um aditivo do tipo chaperona artificial, para permitir o perfeito renovelamento das proteínas (LIRA et al., 2007).



#### Figura 4.4- Eluatos da coluna Q-Sepharose (Troca iônica)

Gel SDS-PAGE 10% corado com Coomassie blue mostrando perfil de separação dos eluatos da coluna de troca iônica. A proteína rTcRPA-1 possui aproximadamente 51kDa e se encontra em abundância nas linhas 1 e 2. M.W. representa o marcador de peso molecular: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas)



#### Figura 4.5- Purificação da proteína rTcRPA-1 em coluna de afinidade

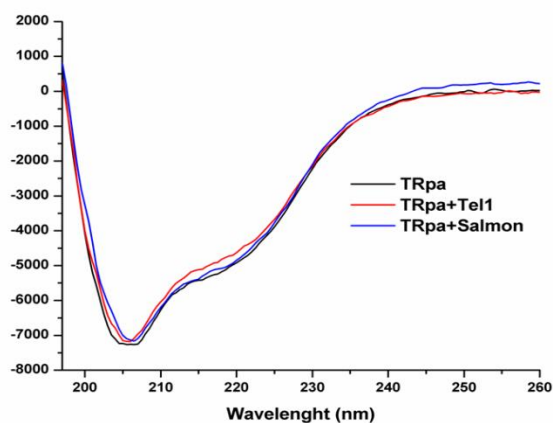
Gel SDS-PAGE 10% corado com Coomassie blue. IPTG+ representa o extrato bacteriano após 24 horas de indução com IPTG. N.I. representa o extrato bacteriano na ausência de IPTG e P representa a proteína rTcRPA-1 purificada após cromatografia de afinidade. M.W. representa o marcador de peso molecular: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas).

#### 4.4 Análise da estrutura secundária da proteína rTcRPA-1 por espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

Esta técnica é amplamente utilizada para estimar a quantidade de estrutura secundária de proteínas através da análise dos sinais característicos nos espectros. A avaliação da estabilidade de uma proteína por CD pode oferecer informações sobre a presença de domínios com diferentes estabilidades e sobre processos dinâmicos como interações com ligantes (RAMOS, 2004). Foi realizado ensaios de Dicroísmo Circular com o grupo do Prof. Marcos Fontes, para analisar se a proteína purificada rTcRPA-1 estava enovelada para futura utilização em ensaios de atividade.

O espectro de CD da TcRPA-1 (Figura 4.6) indica uma curva característica de proteínas enoveladas ricas em folhas beta e, portanto uma proteína adequada para utilização em ensaios de interação. Oligos teloméricos Tel1 (5 repetições de TTAGGG) e DNA esperma de salmão sonificado foram adicionados a amostra contendo a proteína purificada. A tabela 3 mostra uma predição da quantidade dos elementos de estrutura secundária, com e sem DNAs, utilizando-se o algoritmo CONTINNL (SREERAMA; WOODY, 2000) para a deconvolução da curva. A proteína rTcRPA-1 sofre uma mudança em sua estrutura quando em contato com DNA telomérico, sugerindo assim sua interação com esse tipo de DNA. O DNA esperma de salmão foi utilizado inicialmente como controle, porém como veremos a seguir, a

proteína TcRPA-1 possui afinidade pela fita G telomérica e o DNA esperma de salmão possui a mesma sequência telomérica que os tripanossomatídeos, portanto é muito provável que a maioria da TcRPA-1 interagiu com esta sequência, o que está de acordo com a similaridade na predição de estruturas secundárias em relação a Tel-1 (Figura 4.6).



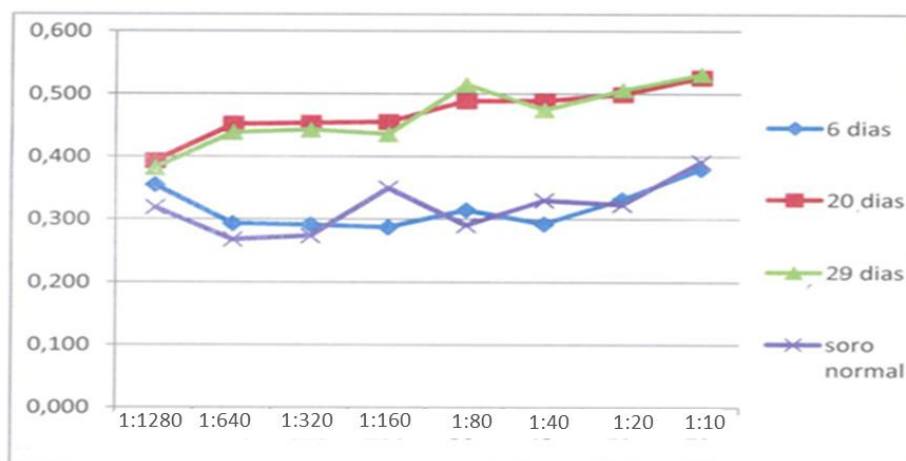
	Helix Elements	Beta content	Turns	Unordered
<i>TcRpa-1</i>	15,1%	32,8%	21,0%	31,2%
<i>TcRpa-1+Tel1</i>	14,3%	33,7%	21,1%	30,9%
<i>TcRpa-1+Salmon Sperm DNA</i>	14,6%	33,7%	20,7%	31,0%

#### Figura 4.6- Espectro de CD da proteína rTcRPA-1

Espectro de Dicroísmo Circular de rTcRPA-1 na presença ou ausência de sequência telomérica e DNA de esperma de salmão. A tabela indica a predição da quantidade dos elementos de estrutura secundária da proteína rTcRPA-1 realizada a partir do espectro de CD obtido utilizando o algoritmo CONTINLL (SREERAMA; WOODY, 2000).

#### 4.5 Anti-RPA-1 reconhece rTcRPA-1 em ensaios de ELISA

Testes de ELISA foram realizados para comprovar a eficácia dos anticorpos provenientes do soro de três camundongos inoculados com a proteína TcRPA-1 recombinante. Os três soros foram capazes de reconhecer o antígeno TcRPA-1, sendo que o soro do camundongo 1 apresentou maior titulação (Figura 4.7).

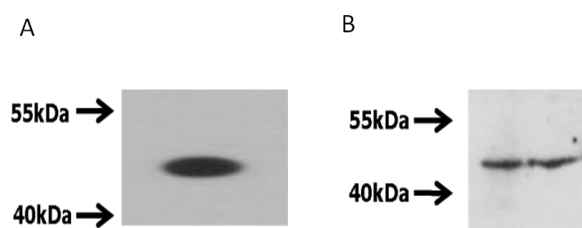


#### Figura 4.7- Soro anti-RPA-1 reconhece rTcRPA-1 após 20 dias de inoculação

A placa foi sensibilizada com a proteína rTcRPA-1 e incubada com concentrações crescentes (eixo X) de soros obtidos após diferentes dias depois da primeira imunização. O eixo Y corresponde a unidades de leitura realizadas pelo VICTOR™ X5/2030 Multilabel Reader – PerkinElmer.

#### 4.6 Anti-RPA-1 reconhece rTcRPA-1 e TcRPA-1 de extrato de *T. cruzi* em ensaios de Western Blotting

Para verificar e garantir a pureza do soro produzido foram realizados ensaios de *Western blotting* com extrato de bactéria induzido contendo a proteína recombinante (Figura 4.8 A) e com extrato de epimastigotas de *T. cruzi* contendo a proteína endógena (Figura 4.8 B). O resultado mostra que o soro reconhece a proteína recombinante e endógena com alto grau de pureza.

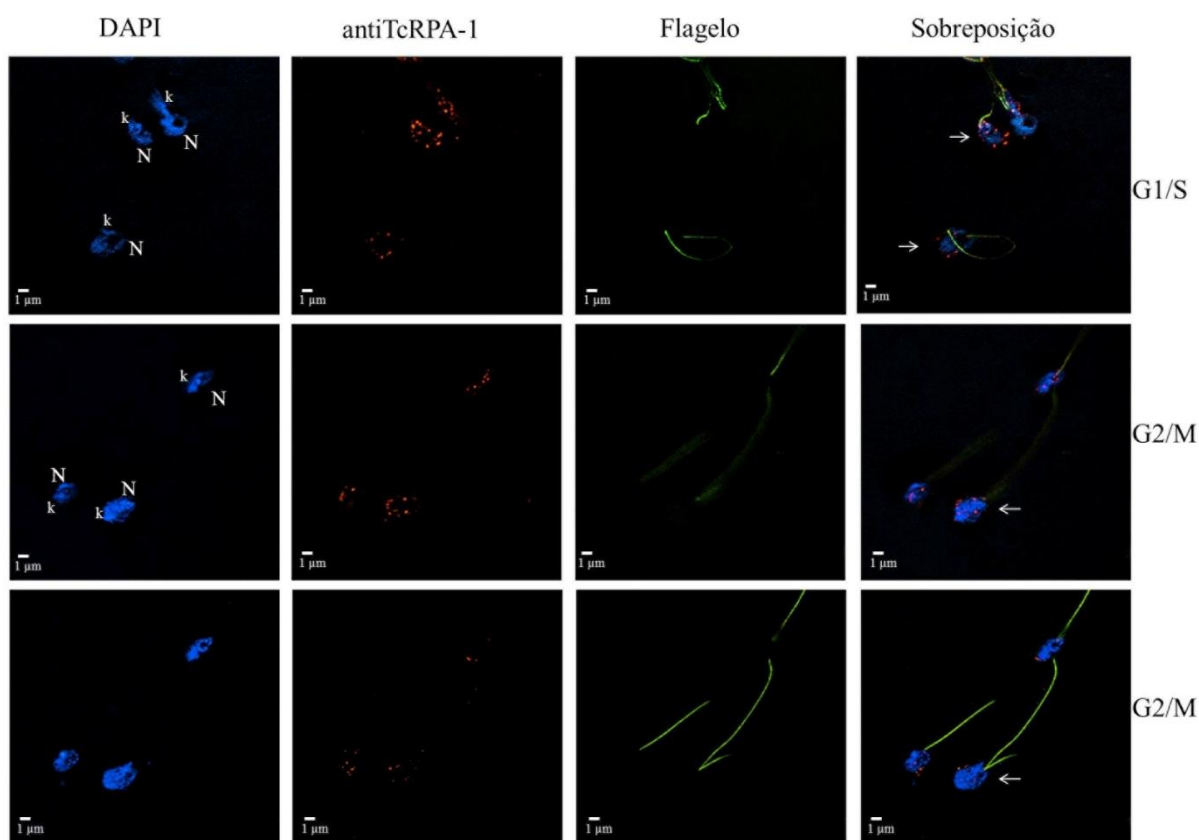


#### Figura 4.8- A proteína TcRPA-1 é reconhecida pelo soro anti-RPA-1

Extrato de bactérias expressando a proteína recombinante rTcRPA-1 (A) e extrato da forma epimastigota (B) foram submetidos a SDS-PAGE, transferidos para nitrocelulose e incubados com soro anti-RPA-1.

#### 4.7 A proteína TcRPA-1 possui localização nuclear e interage com o DNA em todas as fases do ciclo celular

A fim de verificar a localização intracelular da proteína RPA-1 ligada ao DNA de *T. cruzi*, foram realizados ensaios de imunofluorescência com células pré tratadas com tampão CSK, que elimina as proteínas solúveis da célula. Através da morfologia do flagelo conseguimos distinguir a fase G1/S (1 flagelo) da fase G2/M (2 flagelos). De acordo com os resultados, a proteína TcRPA-1 possui localização nuclear e interage com o DNA em todas as fases do ciclo celular na forma de vida epimastigota (Figura 4.9).



**Figure 4.9- RPA-1 está associada ao DNA em diferentes fases do ciclo celular da forma epimastigota de *T. cruzi***

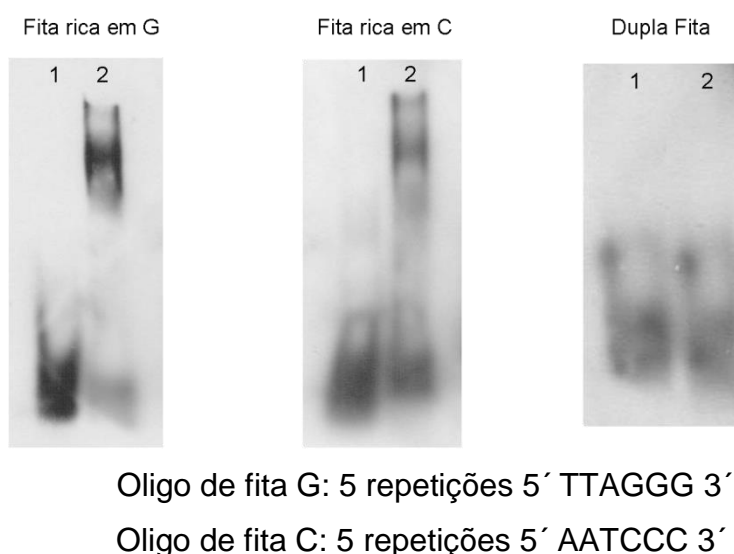
Células de epimastigotas em crescimento exponencial foram tratadas com CSK, fixadas e incubadas com anti-RPA-1 (vermelho) e anti-flagelo (verde) e coradas com DAPI (azul). N- núcleo, k- cinetoplasto. Os quadros G2/M possuem os mesmos parasitos, com visualização em planos diferentes para melhor observação das marcações.

#### 4.8 rTcRPA-1 interage com fita simples telomérica *in vitro*

Após verificar que a proteína TcRPA-1 interage com o DNA *in vivo* na forma epimastigota, buscamos compreender sua possível interação com a sequência telomérica. Experimentos de EMSA permitem averiguar interação *in vitro* entre uma proteína de interesse e um oligonucleotídeo simples fita ou dupla fita de DNA marcado.

Com a finalidade de verificarmos se a proteína rTcRPA-1 tem a capacidade de interagir *in vitro* com DNA telomérico, oligos com a sequência telomérica de *Trypanosoma cruzi* foram desenhados.

De acordo com o ensaio de EMSA realizado, a rTcRPA-1 interage *in vitro* com os oligos teloméricos correspondente a fita simples rica em G e fita simples rica em C (Figura 4.10). Já o oligo telomérico dupla fita não interagiu com a proteína rTcRPA-1.



**Figura 4.10- TcRPA-1 interage com fita simples telomérica rica em G e rica em C *in vitro***

Oligo marcado na ausência (linha 1) ou na presença (linha 2) da proteína rRPA-1 foi submetido a eletroforese e transferido para nitrocelulose e detectado com kit específico.

#### 4.9 rTcRPA-1 possui especificidade pela fita rica em G telomérica

Como vimos nos resultados anteriores, a proteína rTcRPA-1 interage com as sequências teloméricas simples fita. Salvo raras exceções, a única fita simples presente nos telômeros das células *in vivo* é a fita rica em G, que compõe o *overhang* telomérico. Baseado nessas informações, buscamos compreender melhor a interação da rTcRPA-1 com a fita telomérica rica em G.

Para estudar essa interação, realizamos competição nos ensaios de EMSA, competindo o oligo de fita G marcado com: i) oligos aleatórios frios (competição inespecífica) e ii) oligos fita G frios (competição específica) (Figura 4.11).

O resultado é mais aparente quando observamos as competições com 100 vezes de oligos não marcados. De acordo com os resultados, a interação da proteína rTcRPA-1 com a fita rica em G é fortemente mantida mesmo na presença de 100 vezes mais de um oligo não telomérico. Ao compararmos os “shifts” da competição 1:100 com fita G fria com as outras sequências, pudemos observar que a fita G telomérica fria desloca a reação da TcRPA-1 com o oligo fita G marcado com muito mais eficiência do que a região subtelomérica (Figura 4.11, B, linha 5), sequência inespecífica presente no meio do cromossomo (Figura 4.11, D, linha 5) ou sequência repetitiva (Figura 4.11, D, linha 7) .

Para confirmar o resultado por outra abordagem, realizamos o experimento com a fita subtelomérica marcada, realizando competições com a fita G telomérica fria ou uma sequência aleatória, de forma semelhante à realizada nas letras B e D. Novamente, ao compararmos o “shift” da competição 1:100 da linha 4 com a linha 7 (figura 4.11 F), observamos que a fita rica em G telomérica fria desloca a interação da TcRPA-1 com sequência subtelomérica com muito mais eficiência, quando comparado com uma sequência aleatória presente no genoma.

Com base nesses dados, concluímos que rTcRPA-1 tem preferência de ligação com a fita rica em G telomérica.



Em A, esquema representativo da localização das sondas utilizadas em um pedaço de cromossomo. Em B, oligo G telomérico foi marcado e incubado somente com rTcRPA-1 (linha 1) ou com rTcRPA-1 na presença de concentrações crescentes (1X e 100X) de oligos frios, a saber: oligo G telomérico (linhas 2 e 3), de oligo sub-telomérico (linhas 4 e 5). Em D, oligo G telomérico marcado e incubado somente com rTcRPA-1 (linha 1) ou com rTcRPA-1 na presença de concentrações crescentes (1X e 100X) de oligos frios: oligo G telomérico (linhas 2 e 3), de oligo inespecífico (linhas 4 e 5) e com oligo contendo sequência repetitiva (linhas 6 e 7). Em F, oligo contendo sequência subtelomérica foi marcado e incubado somente com rTcRPA-1 (linha 1) ou com rTcRPA-1 na presença de concentrações crescentes (1X, 10X e 100X) de oligos frios: oligo G telomérico (linhas 2, 3 e 4) ou de oligo inespecífico (linhas 5, 6 e 7). A intensidade das bandas obtidas nos ensaios foi quantificada e, quando possível, a média e desvio padrão de três experimentos, plotada nos gráficos das figuras C (experimento em B), E (experimento em D) e G (experimento em F). O programa utilizado para quantificação foi Image J.

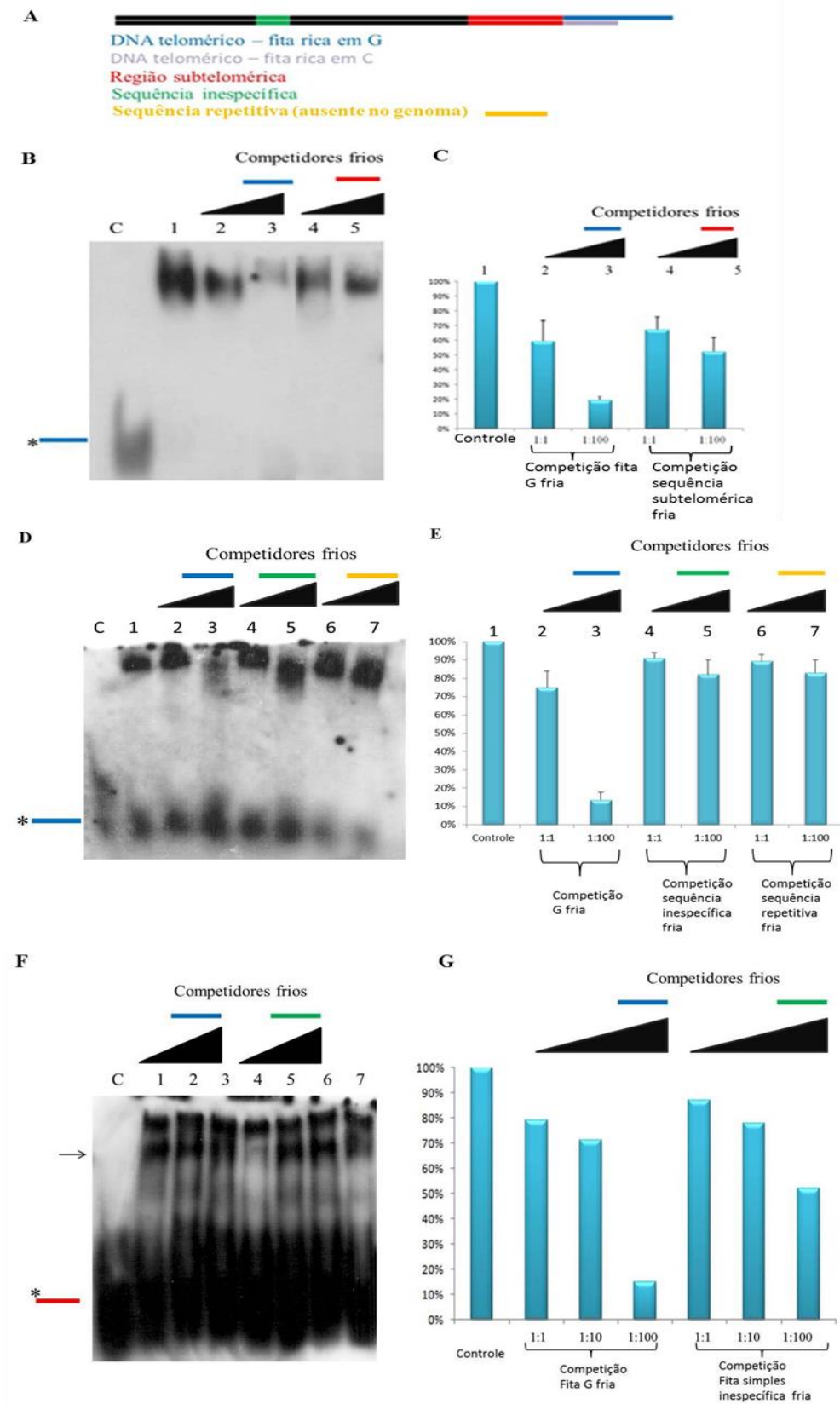
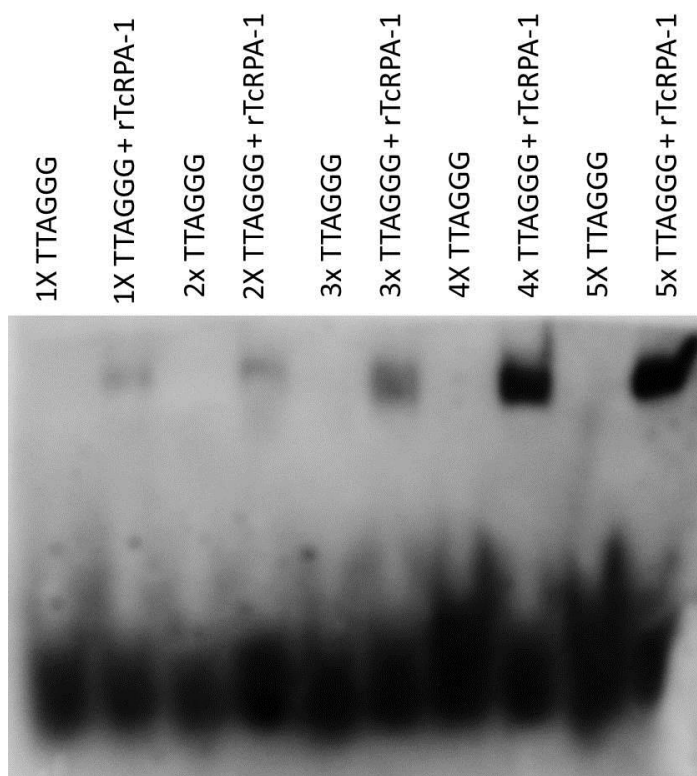


Figura 4.11- Ensaios de competição feitos com a fita rica em G telomérica

#### 4.10 Basta apenas uma repetição TTAGGG para a rTcRPA-1 interagir com o DNA telomérico

A fim de verificar quantas repetições teloméricas são necessárias para a rTcRPA-1 interagir com o telômero, ensaios de EMSA foram realizados utilizando-se oligos teloméricos marcados da fita rica em G com diferentes tamanhos (de 6nt até 30nt). De acordo com o resultado (Figura 4.12), com apenas uma repetição telomérica TTAGGG, a TcRPA-1 consegue interagir com a sequencia telomérica *in vitro*. O resultado sugere também que a ligação da rTcRPA-1 é mais estável com o aumento do tamanho do DNA telomérico simples fita, observado pelo aumento da intensidade das bandas em oligonucleotídeos maiores.



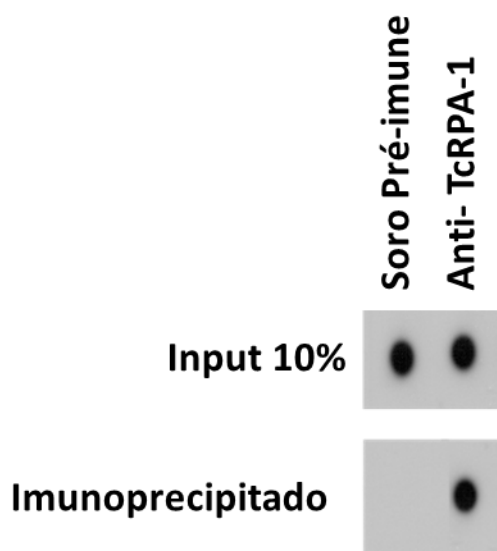
**Figura 4.12- TcRPA-1 é capaz de interagir com apenas uma repetição telomérica**

Oligos contendo de 1 a 5 unidades repetitivas de telômero foram mantidos na ausência ou presença de rRPA-1. Após incubação, as amostras foram submetidas a eletroforese, transferidas para membrana de nitrocelulose e reveladas de acordo com o kit específico.

#### 4.11 TcRPA-1 interage *in vivo* com os telômeros da forma epimastigota

Após a conclusão que a proteína TcRPA-1 tem a capacidade de interagir com o DNA telomérico *in vitro*, buscamos analisar a sua possível interação com os telômeros *in vivo* na forma epimastigota através de ensaios de Imunoprecipitação de cromatina (ChIP) e por ensaios de FISH/IF.

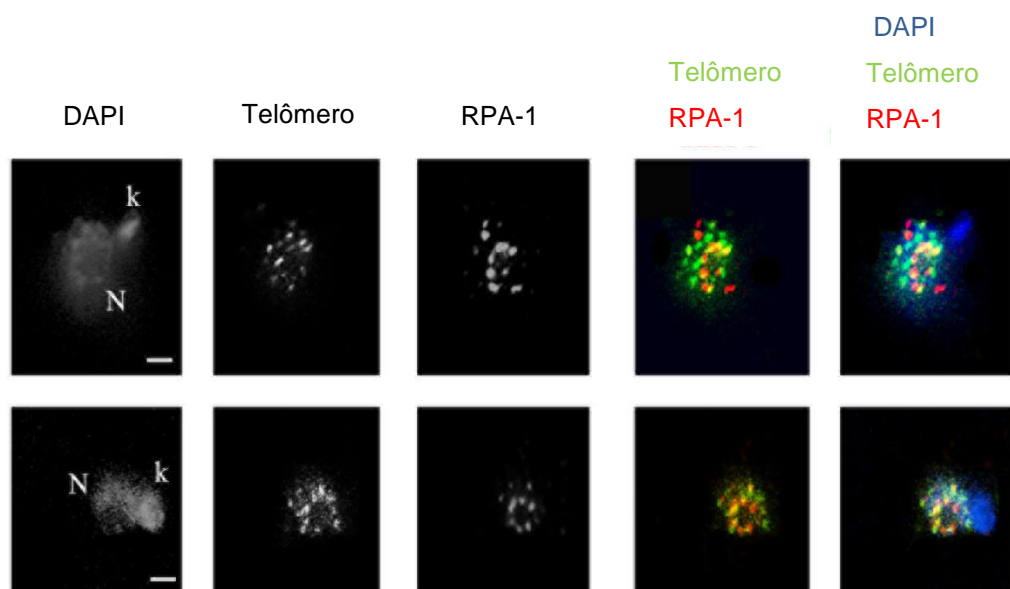
O anticorpo que reconhece a proteína TcRPA-1 imunoprecipitou a sequência telomérica, confirmando a interação *in vivo* de TcRPA-1 com essa região (Figura 4.13).



#### Figura 4.13- A proteína TcRPA-1 imunoprecipitou a sequência telomérica

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram submetidas a ensaio de imunoprecipitação de cromatina utilizando-se anti-rTcRPA-1 ou soro pré-imune, como controle. O DNA obtido foi imobilizado em membrana de nylon e hibridizado com sonda que reconhece a fita G telomérica.

Além disso, a RPA-1 co-localiza com os telômeros nos ensaios de FISH/IF. Praticamente todas as células na lâmina possuem alguma co-localização, sugerindo que a RPA-1 interage com os telômeros mesmo nas fases não replicativas do ciclo celular.



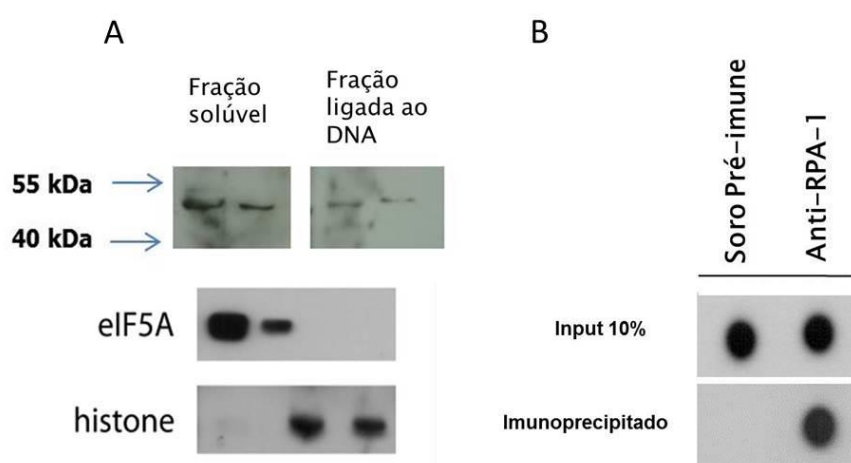
**Figura 4.14 – A proteína TcRPA-1 co-localiza com o DNA telomérico *in vivo***

Epimastigotas foram aderidos a lâmina, fixados, permeabilizados e incubados com anti-TcRPA-1. Após nova fixação, as células foram hibridadas com sonda para DNA telomérico. As células foram também coradas com DAPI. Nas sobreposições, o telômero está marcado em verde, a proteína RPA-1 em vermelho e o DAPI em azul. N- núcleo, k- cinetoplasto. Barras representam 1  $\mu\text{m}$ .

#### 4.12 TcRPA-1 interage *in vivo* com as formas tripomastigotas

A proteína TcRPA-1 participa da replicação da região telomérica em diversos organismos, desde leveduras até mamíferos. Para verificar se a função da proteína TcRPA-1 no telômero é apenas replicativa, resolvemos trabalhar com a forma de vida tripomastigota, que não replica seu DNA e a atividade de telomerase não foi encontrada (MUNÕZ; COLLINS, 2004).

Primeiramente verificamos se a proteína TcRPA-1 interage com o DNA nessa forma de vida através de ensaio de extrato diferencial com tratamento com tampão CSK, que separa o extrato em fração solúvel e insolúvel. De acordo com o resultado, a proteína TcRPA-1 interage com a cromatina nessa forma de vida (Figura 4.15, A). Posteriormente, para checar se esta interação ocorre na região telomérica, ensaios de imunoprecipitação de cromatina foram realizados e mostraram que a TcRPA-1 interage com os telômeros nesta forma de vida não replicativa ( Figura 4.15, B).



### Figura 4.15 – TcRPA-1 interage com DNA telomérico na forma tripomastigotas

Em A, extratos de tripomastigotas de *T. cruzi* foram tratadas com tampão CSK por duas vezes e o sobrenadante de cada tratamento coletado como fração solúvel. Em seguida, o pellet obtido foi digerido com DNase por duas vezes e o sobrenadante de cada fração foi coletada como fração ligada ao DNA. As amostras foram submetidas a western blotting utilizando diferentes anticorpos. Em B, formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram utilizadas em ensaio de imunoprecipitação de cromatina utilizando anti-rTcRPA-1 ou soro pré-imune, como controle. O DNA obtido foi imobilizado em membrana de nylon e hibridizado com sonda que reconhecem a fita G telomérica.

### 4.13 TcRPA-1 participa da replicação do DNA

A interação da RPA-1 com a forma tripomastigota, que não replica seu DNA, nos fez questionar se a TcRPA-1, como em outros organismos, participaria da maquinaria de replicação do DNA ou cumpre funções totalmente diferenciadas dos eucariontes em tripanossomatídeos. Para verificar a participação dessa proteína na replicação, realizamos na forma epimastigota ensaios de incorporação de EdU, um análogo de timidina. Caso esteja ocorrendo a replicação na célula, as regiões do DNA onde o EdU foi ou está sendo incorporado ficam marcadas em verde.

Para este ensaio, os epimastigotas foram tratados previamente com o tampão CSK para a remoção das proteínas que não interagem com DNA. A co-localização de EdU com RPA-1 (Figura 4.16) sugere que esta proteína está envolvida na replicação do DNA. Além disso, pudemos observar nas células pontos onde a RPA-1 não co-localiza com EdU, provavelmente interagindo com DNA em outras regiões, podendo estar cumprindo outras funções além da replicação.



**Figura 4.16 Proteína TcRPA-1 co-localiza com centros de replicação em epimastigotas**

Epimastigotas foram mantidos na presença de EdU por 20 min. As células foram então tratadas com tampão CSK e incubadas com anti- TcRPA-1. N- núcleo, k- cinetoplasto. Barra representa 1  $\mu\text{m}$ .

## 5 DISCUSSÃO

Iniciamos este trabalho com a produção e purificação da proteína TcRPA-1 recombinante e anticorpos contra essa proteína. Com a rTcRPA-1 purificada, realizamos ensaio de dicroísmo circular com a presença de oligo telomérico da fita simples rica em G, que mostrou que a proteína rTcRPA-1 muda ligeiramente de conformação quando comparada a proteína rTcRPA-1 sozinha, sugerindo interação com essa sequência de DNA.

Para confirmar a ocorrência da interação com a sequência telomérica, ensaios de EMSA foram realizados e mostraram que a proteína TcRPA-1 tem a capacidade de interagir com as sequências teloméricas ricas em G e C, mas não interage com o telômero dupla fita.

Através de ensaios de EMSA, pudemos também observar que a TcRPA-1 possui especificidade pela fita rica em G do telômero. As competições realizadas com sequências presentes no meio do genoma, sequência da região subtelomérica ou sequência aleatória repetitiva não deslocaram a ligação TcRPA-1-fita G da mesma forma que a própria fita G telomérica deslocou. Além disso, quando marcamos em outro ensaio a região subtelomérica, pudemos observar também que a fita rica em G telomérica desloca com maior facilidade a interação RPA-1-seqsubtelomérica, quando comparada a outra sequência (Figura 4.11).

De acordo com a literatura, o complexo RPA de eucariotos não possui especificidade por nenhuma sequência (FLYNN; CHANG; ZOU, 2012), portanto possuir afinidade pela sequência da fita rica em G, presente no *overhang* telomérico, sugere fortemente que a RPA-1 pode cumprir um papel diferenciado no telômero de *T. cruzi*, quando comparada a RPA-1 de outros eucariotos. Para cumprir um papel de proteção, as proteínas ligantes de simples fita telomérica devem reconhecer a sequência telomérica no meio de tantas outras no genoma, por isso a especificidade pela sequência telomérica é uma das principais características de proteínas que cumprem essa função, como POT-1 e Cdc-13 (LEI et al., 2004; LOAYZA et al., 2004; HUGHES et al., 2000).

Pudemos observar também através de ensaios de EMSA que basta apenas uma repetição telomérica de 6 nucleotídeos para a TcRPA-1 interagir com o DNA. Este dado é importante, pois não se sabe o tamanho exato do *overhang* do *T. cruzi*, o tamanho foi estimado como sendo pequeno, podendo chegar a ser apenas 9



nucleotídeos em determinados período do ciclo celular (CHIURILLO et al.,1999). Portanto, a proteína TcRPA-1 consegue interagir com o telômero do *T. cruzi* mesmo se seu *overhang* for realmente muito pequeno.

Após a caracterização da ligação RPA-1-fita G *in vitro*, observamos que a TcRPA-1 imunoprecipitou a sequencia telomérica da fita G através de ensaios de imunoprecipitação de cromatina. Ensaios de FISH/IF mostraram também a co-localização parcial em praticamente todas as células da RPA-1 com o telômero. Estes dados comprovam a interação *in vivo* da RPA-1 com o telômero na forma de vida epimastigota. Mais que isto, os resultados sugerem que RPA-1 interage com telômero mesmo nas fases do ciclo celular onde não há duplicação de DNA, o que aponta para um papel de RPA-1 distinto da replicação do DNA nos telômeros, que é um dos papeis fundamentais da RPA-1 nos demais eucariontes. A sonda utilizada no FISH foi uma sonda de 9 nucleotídeos que reconhece a fita C telomérica, reconhecendo assim regiões teloméricas que podem estar distantes do *overhang*, portanto uma co-localização parcial não significa que a RPA-1 não está ligada a todos os telômeros. Além disso o ensaio de FISH/IF possui um tratamento intenso na célula, que pode prejudicar os epítomos que o anticorpo reconhece na proteína TcRPA-1. Experimentos de FISH/IF com sonda que reconhece a fita G telomérica ainda estão sendo padronizados.

Em seu ciclo de vida, o *T. cruzi* possui a forma tripomastigota sanguícola, que não replica seu DNA. Observamos primeiramente que nesta forma de vida, a proteína TcRPA-1 se encontra ligada ao DNA (Figura 4.15, A). A partir desse resultado, realizamos ensaios de imunoprecipitação de cromatina para verificar se a ligação da TcRPA-1 ocorre no DNA telomérico ou apenas em outras regiões do DNA. Surpreendentemente, a proteína TcRPA-1 imunoprecipitou a sequência da fita G telomérica, comprovando a interação *in vivo* desta proteína com o telômero nesta forma de vida (Figura 4.15, B). Este resultado corrobora com o observado para epimastigota, sugerindo fortemente que a proteína TcRPA-1 interage com o DNA telomérico para funções além da replicação de DNA . Além da parada na replicação de DNA convencional, não foi identificada a atividade da enzima telomerase em formas de vida tripomastigota sanguícola (MUÑOZ; COLLINS, 2004). Portanto, a princípio excluimos a possibilidade do complexo RPA estar ligado ao telômero nessa forma de vida para recrutar ou facilitar a atividade da telomerase (função descrita em

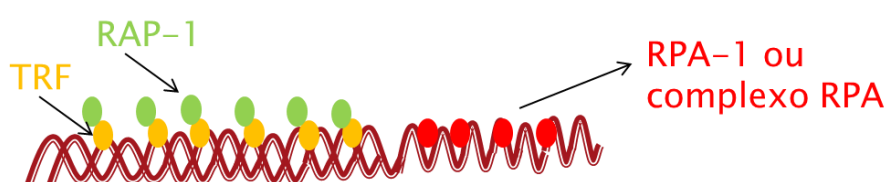
leveduras), fortalecendo ainda mais a nossa hipótese que a TcRPA-1 exerce um papel diferenciado nessa região.

De acordo com nossos resultados, a proteína TcRPA-1 não parece se comportar como as RPA-1 de outros eucariotos nos telômeros, portanto houve um questionamento se a TcRPA-1 realiza funções conservadas entre os eucariotos em outras regiões do genoma, como por exemplo sua participação na maquinaria de replicação da célula. Os ensaios de incorporação de EdU seguidos de imunofluorescência sugeriram que apesar das peculiaridades desta proteína em tripanossomatídeos, ela parece estar envolvida com a replicação de DNA, observados pelos pontos de co-localização desta proteína com os nucleotídeos marcados incorporados. Portanto, a TcRPA-1 provavelmente estabiliza a simples fita aberta na forquilha de replicação, como descrito para outros eucariotos (WOLD, 1988; FANNING; KLIMOVICH; NAGER, 2006).

Apesar dos avanços nas pesquisas entre telômeros e maquinaria de reparo, essa relação ainda está longe de ser bem compreendida (TEIXEIRA, 2013). A RPA-1 de tripanossomatídeos não possui o domínio 70N na sua região N-terminal, que é fundamental para ativação de *checkpoint* em outros eucariotos. Esse domínio é responsável pela interação da RPA com proteínas como RAD9, ATRIP, Mre11, Ddc2 (XU et al., 2008). A resposta a danos no telômero com ligação de RPA é sinalizada pela via ATR-ATRIP em mamíferos ou seu homólogo Mec1-Ddc2 em leveduras (TEIXEIRA, 2013). A ausência do domínio 70N, responsável pelo recrutamento dessas proteínas em outros eucariotos, e os estudos realizados em *Leishmania* nos faz questionar se a RPA-1 de tripanossomatídeos está diretamente envolvida na sinalização e recrutamento de proteínas em resposta a danos no DNA. Alternativamente, A RPA-1 poderia apenas ligar a simples fita presente na quebra de DNA para estabilizar e proteger contra danos nucleolíticos (o que explicaria a co-localização de RPA-1 com LmHus1, sem a evidência de interação entre estes complexos, ver seção 1.7). Neste caso, a sinalização de danos seria realizada por outros componentes e a TcRPA-1 poderia se ligar ao *overhang* telomérico sem sinalizar danos naquela região, diferentemente do que ocorre em outros eucariotos.

Os resultados desse trabalho abrem uma nova perspectiva no estudo e evolução de proteínas teloméricas. A ausência de Cdc13, CTC-1, POT1 e outras proteínas ligantes do *overhang* telomérico no genoma de *T. cruzi*, a especificidade de RPA-1 pela fita G telomérica e a interação *in vivo* dessa proteína com os telômeros em

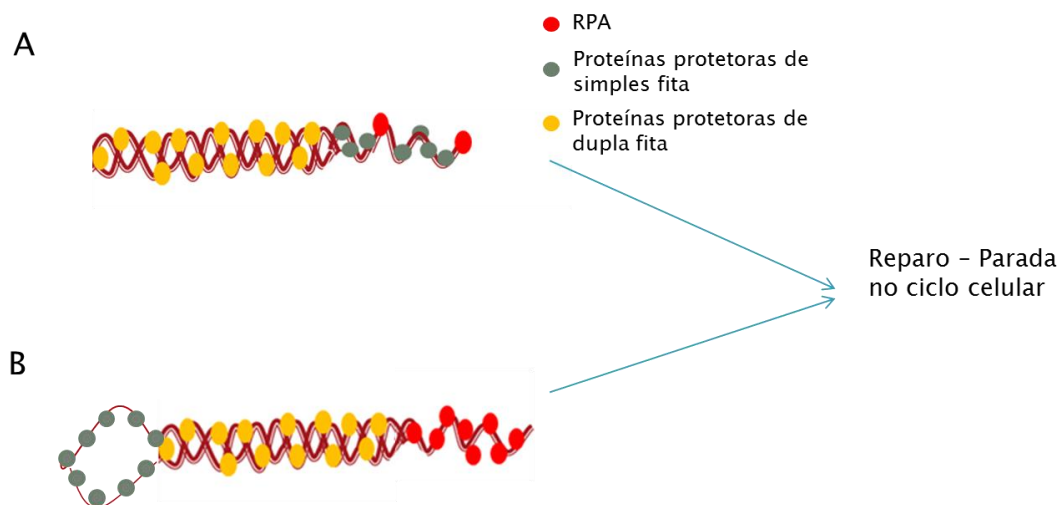
formas não replicativas e sem atividade de telomerase observada fortalecem nossa hipótese inicial que a RPA-1 poderia estar cumprindo um papel de proteção no telômero (Figura 5.1), assim como as proteínas POT1 e Cdc13 em mamíferos e leveduras, respectivamente. Caso nossa hipótese esteja correta, a proteína RPA-1 de *T. cruzi* seria uma possível ancestral de proteínas RPA-like protetoras da simples fita dos telômeros em eucariotos superiores, porém são necessárias mais evidências experimentais para a confirmação dessa hipótese.



**Figura 5.1. Possível modelo esquemático do telômero de *T. cruzi***

Proposição da composição dos telômeros de *T. cruzi*, com a TcRPA-1 sendo uma das proteínas constitutivas dos telômeros, protegendo estes terminais contra danos e contra a maquinaria de reparo da célula.

Apesar das evidências deste trabalho fortalecerem nossa hipótese de proteção, não descartamos a possibilidade da proteína TcRPA-1 estar envolvida em outra função que não proteção na região telomérica, com uma maior semelhança a funções descritas para os eucariotos superiores. Se este for o caso, a proteína RPA-1 poderia estar ligada aos telômeros de tripomastigotas para estimular uma resposta de reparo na célula, já que a replicação é ausente. Neste contexto, os telômeros dos tripomastigotas poderiam estar desencapados com a perda de proteínas do seu complexo de proteção ou o desligamento de proteínas de replicação poderiam levar a ocorrência de forquilhas empacadas nos telômeros, com a porção de fita simples coberta de RPA-1 (Figura 5.2). Em ambos os casos, o resultado final seria o disparo de uma resposta de *checkpoint*, que poderia vir a ser uma das causas de uma parada no ciclo celular nesta forma de vida. Porém a afinidade pela fita G telomérica é um forte contraponto para essa hipótese, uma vez que o reconhecimento preferencial da região telomérica em períodos inadequados poderia sinalizar uma resposta a danos nesta região, comprometendo a integridade celular.



**Figura 5.2 Modelo esquemático da RPA-1 sinalizando reparo nos terminais cromossômicos da forma tripomastigota de *T. cruzi***

Em A, a proteína TcRPA-1 poderia ligar o telômero das formas tripomastigotas para sinalizar a desproteção/encurtamento telomérico. Em B, forquilhas empacadas provenientes da parada na replicação poderiam estar cobertas com RPA-1, para sinalizar o dano nessa região.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho caracterizou a interação da proteína TcRPA-1 com a região telomérica, com foco no *overhang*, já que a RPA-1 é uma proteína ligante de fita simples. Os resultados deste trabalho abrem uma nova perspectiva em relação a uma possível nova função protéica para a RPA-1 de *T. cruzi*, baseado principalmente na afinidade pela sequência telomérica e interação em formas de vida não replicativas.

Caso futuros experimentos comprovem que está hipótese não é verdadeira, os resultados deste trabalho auxiliam a compreensão da interação RPA-1-telômero, nunca descrita antes para *T. cruzi* e ainda abrem a discussão da possibilidade da presença de recombinação homóloga ou resposta de reparo a danos no DNA estar disparada nos telômeros de tripomastigotas, podendo estar diretamente relacionada com a parada da replicação nesta forma de vida devido a ativação de resposta de *checkpoint*.

## REFERÊNCIAS\*

- ANANTHA, R. W.; VASSIN, V. M.; BOROWIEC, J. A. Sequential and synergistic modification of human RPA stimulates chromosomal DNA repair. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 49, p. 35910-35923, 2007.
- ANANTHA, R. W.; SOKOLOVA, E.; BOROWIEC, J. A. RPA phosphorylation facilitates mitotic exit in response to mitotic DNA damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 35, p. 12903-12908, 2008.
- AUBERT, G.; LANSDORP, P. M. Telomeres and aging. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 2, p. 557-579, 2008.
- BARROS, R. R. Moraes et al. Anatomy and evolution of telomeric and subtelomeric regions in the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 229, 2012.
- BLACKBURN, E. H. Switching and signaling at the telomere. **Cell**, v. 106, n. 6, p. 661-673, 2001.
- BOCHKAREVA, E. et al. Structure of the *major* single-stranded DNA-binding domain of replication protein A suggests a dynamic mechanism for DNA binding. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 3, p. 612-618, 2001.
- BOCHKAREVA, E. et al. Structure of the RPA trimerization core and its role in the multistep DNA-binding mechanism of RPA. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 7, p. 1855-1863, 2002.
- BOCHKAREV, A.; BOCHKAREVA, E. From RPA to BRCA2: lessons from single-stranded DNA binding by the OB-fold. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14, n. 1, p. 36-42, 2004.
- BONETTI, D. et al. Telomere-end processing: mechanisms and regulation. **Chromosoma**, p. 1-10, 2013.
- CANO, M. I. N. et al. Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 7, p. 3616-3621, 1999.
- CANO, M. I. N. Telomere biology of trypanosomatids: more questions than answers. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 9, p. 425-429, 2001.
- CAPRA, J. A. et al. G-quadruplex DNA sequences are evolutionarily conserved and associated with distinct genomic features in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS Computational Biology**, v. 6, n. 7, p. e1000861, 2010.

---

\* De acordo com :  
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CAVERO, S.; LIMBO, O.; RUSSELL, P. Critical functions of Rpa3/Ssb3 in S-phase DNA damage responses in fission yeast. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 9, p. e1001138, 2010.

CDC (Center for Disease Control and Prevention), 2011 Parasite- American Tripanosomiasis (Chagas Disease). Disponível em < <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html> > acesso em: 18 de novembro de 2013

CHAI, W. et al. Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands. **Molecular Cell**, v. 21, n. 3, p. 427-435, 2006.

CHAN, S.R.; BLACKBURN, E. H. Telomeres and telomerase. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1441, p. 109-122, 2004.

CHEN, L. Y; REDON, S.; LINGNER, J. The human CST complex is a terminator of telomerase activity. **Nature**, 2012.

CHIURILLO, M. A. et al. Organization of telomeric and sub-telomeric regions of chromosomes from the protozoan parasite < i> *Trypanosoma cruzi*</i>. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 173-183, 1999.

CHURIKOV, D. et al. Cdc13 at a crossroads of telomerase action. **Frontiers in oncology**, v. 3, 2013.

DA SILVA, M. S. et al. The *Leishmania amazonensis* TRF (TTAGGG repeat-binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 136, 2010.

DA SILVEIRA, R. D. C. V. et al. The natural absence of RPA1N domain did not impair *Leishmania amazonensis* RPA-1 participation in DNA damage response and telomere protection. **Parasitology**, v. 140, n. 04, p. 547-559, 2013.

DAI, X. et al. Molecular steps of G-overhang generation at human telomeres and its function in chromosome end protection. **The EMBO Journal**, v. 29, n. 16, p. 2788-2801, 2010.

DAMASCENO, J. D.; NUNES, V. S.; TOSI, L. R. O. LmHus1 is required for the DNA damage response in *Leishmania major* and forms a complex with an unusual Rad9 homologue. **Molecular Microbiology**, v. 90, n. 5, p. 1074-1087, 2013.

DE LANGE, T. T-loops and the origin of telomeres. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 4, p. 323-329, 2004.

DE LANGE, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. **Genes & Development**, v. 19, n. 18, p. 2100-2110, 2005.

DI FAGAGNA, F. D. A. et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. **Nature**, v. 426, n. 6963, p. 194-198, 2003.

DMITRIEV, P. V.; PETROV, A. V.; DONTSOVA, O. A. Yeast telosome complex: components and their functions. **Biochemistry (Moscow)**, v. 68, n. 7, p. 718-734, 2003.

DREESEN, O.; LI, B.; CROSS, G.A.M. Telomere structure and function in trypanosomes: a proposal. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 70-75, 2007.

EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-415, 2005.

ELIAS, M. C.; NARDELLI, S. C.; SCHENKMAN, S.. Chromatin and nuclear organization in *Trypanosoma cruzi*. **Future microbiology**, v. 4, n. 8, p. 1065-1074, 2009.

FANNING, E.; KLIMOVICH, V.; NAGER, A. R. A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 15, p. 4126-4137, 2006.

FERNÁNDEZ, M. F. et al. Identification of three proteins that associate in vitro with the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* G-rich telomeric strand. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 14, p. 3050-3063, 2004.

FLYNN, R. L.; CHANG, S.; ZOU, L. RPA and POT1: friends or foes at telomeres?. **Cell Cycle**, v. 11, n. 4, p. 652-657, 2012.

FREITAS, L. H. G et al. Identification of the telomere in *Trypanosoma cruzi* reveals highly heterogeneous telomere lengths in different parasite strains. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 12, p. 2451-2456, 1999.

GAO, H. et al. RPA-like proteins mediate yeast telomere function. **Nature Structural & Molecular biology**, v. 14, n. 3, p. 208-214, 2007.

GENSCHEL, J.; MODRICH, Paul. Functions of MutL $\alpha$ , replication protein A (RPA), and HMGB1 in 5'-directed mismatch repair. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 32, p. 21536-21544, 2009.

GILSON, E.; GÉLI, V. How telomeres are replicated. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 825-838, 2007.

GIRAUD-PANIS, M. J. et al. CST meets shelterin to keep telomeres in check. **Molecular Cell**, v. 39, n. 5, p. 665-676, 2010.

GODOY, P.D.M et al. Trypanosome prereplication machinery contains a single functional *orc1/cdc6* protein, which is typical of archaea. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 10, p. 1592-1603, 2009.

GOMMERS-AMPT, J. H. et al.  $\beta$ -D-glucosyl-hydroxymethyluracil: a novel modified base present in the DNA of the parasitic protozoan *T. brucei*. **Cell**, v. 75, n. 6, p. 1129-1136, 1993.



GLOVER, L. et al. Antigenic variation in African trypanosomes: the importance of chromosomal and nuclear context in VSG expression control. **Cellular microbiology**, v. 15, n. 12, p. 1984-1993, 2013.

GRIFFITH, J. D. et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. **Cell**, v. 97, n. 4, p. 503-514, 1999.

GU, P.; CHANG, S. Functional characterization of human CTC1 mutations reveals novel mechanisms responsible for the pathogenesis of the telomere disease Coats plus. **Aging Cell**, v. 12, n. 6, p. 1100-1109, 2013.

HENRICKSEN, L. A.; UMBRICH, CHRISTOPHER B.; WOLD, M. S. Recombinant replication protein A: expression, complex formation, and functional characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 15, p. 11121-11132, 1994.

HERBIG, U. et al. Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, p53, and p21<sup>sup</sup> CIP1<sup>sup</sup>, but Not p16<sup>sup</sup> INK4a<sup>sup</sup>. **Molecular Cell**, v. 14, n. 4, p. 501-513, 2004.

HUGHES, T. R. et al. Identification of the single-strand telomeric DNA binding domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Cdc13 protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 12, p. 6457-6462, 2000.

JACOBS, D. M. et al. Human replication protein A: Global fold of the N-terminal RPA-70 domain reveals a basic cleft and flexible C-terminal linker†. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 14, n. 4, p. 321-331, 1999.

KIBE, T. et al. Fission yeast Taz1 and RPA are synergistically required to prevent rapid telomere loss. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. 6, p. 2378-2387, 2007.

KIM, D. et al. Telomere and subtelomere of *Trypanosoma cruzi* chromosomes are enriched in (pseudo) genes of retrotransposon hot spot and trans-sialidase-like gene families: the origins of *T. cruzi* telomeres. **Gene**, v. 346, p. 153-161, 2005.

KOBAYASHI, Y. et al. Expression of mutant RPA in human cancer cells causes telomere shortening. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 74, n. 2, p. 382-385, 2009.

LARRIVÉE, M.; LEBEL, C.; WELLINGER, R. J. The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. **Genes & Development**, v. 18, n. 12, p. 1391-1396, 2004.

LATRICK, C. M.; CECH, T. R. POT1–TPP1 enhances telomerase processivity by slowing primer dissociation and aiding translocation. **The EMBO Journal**, v. 29, n. 5, p. 924-933, 2010.

LEI, M.; PODELL, E. R.; CECH, T. R. Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 11, n. 12, p. 1223-1229, 2004.

LEWIS, K. A.; WUTTKE, D. S. Telomerase and telomere-associated proteins: structural insights into mechanism and evolution. **Structure**, v. 20, n. 1, p. 28-39, 2012.

LI, B.; ESPINAL, A.; CROSS, G. A. M. Trypanosome telomeres are protected by a homologue of mammalian TRF2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 12, p. 5011-5021, 2005.

LIANG, X. H. et al. trans and cis splicing in trypanosomatids: Mechanism, factors, and regulation. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 5, p. 830-840, 2003.

LIRA, C. B. B. et al. DNA and heparin chaperone the refolding of purified recombinant replication protein A subunit 1 from *Leishmania amazonensis*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1790, n. 2, p. 119-125, 2009.

LIU, C. C. et al. Cdk1 Regulates the Temporal Recruitment of Telomerase and Cdc13-Stn1-Ten1 Complex for Telomere Replication. **Molecular and Cellular Biology**, v. 34, n. 1, p. 57-70, 2014.

LOAYZA, D. et al. DNA Binding Features of Human POT1 A NONAMER 5'-TAGGGTTAG-3' MINIMAL BINDING SITE, SEQUENCE SPECIFICITY, AND INTERNAL BINDING TO MULTIMERIC SITES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 13241-13248, 2004.

LONGHESE, M. P.. DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres. **Genes & Development**, v. 22, n. 2, p. 125-140, 2008.

LOPES, A. H. et al. Trypanosomatids: odd organisms, devastating diseases. **Open Parasitol J**, v. 4, p. 30-59, 2010.

LUCIANO, P. et al. RPA facilitates telomerase activity at chromosome ends in budding and fission yeasts. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 8, p. 2034-2046, 2012.

LUE, N. F. et al. The telomere capping complex CST has an unusual stoichiometry, makes multipartite interaction with G-Tails, and unfolds higher-order G-Tail structures. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 1, p. e1003145, 2013.

MARTÍNEZ, P.; BLASCO, M. A. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 3, p. 161-176, 2011.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S. et al. Gene expression in trypanosomatid parasites. **BioMed Research International**, v. 2010, 2010.

MER, G. et al. Structural basis for the recognition of DNA repair proteins UNG2, XPA, and RAD52 by replication factor RPA. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 449-456, 2000.

MERCURI, L. P. et al. Ordered Mesoporous Silica SBA-15: A New Effective Adjuvant to Induce Antibody Response. **Small**, v. 2, n. 2, p. 254-256, 2006.

MIYAKE, Y. et al. RPA-like mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 complex binds to single-stranded DNA and protects telomeres independently of the Pot1 pathway. **Molecular Cell**, v. 36, n. 2, p. 193-206, 2009.

MÜNCH, Sandra et al. The Tumor Suppressor PML Specifically Accumulates at RPA/Rad51-Containing DNA Damage Repair Foci but Is Nonessential for DNA Damage-Induced Fibroblast Senescence. **Molecular and cellular biology**, v. 34, n. 10, p. 1733-1746, 2014.

MUÑOZ-JORDÁN, J. L. et al. t-loops at trypanosome telomeres. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 3, p. 579-588, 2001.

MUNOZ, D. P.; COLLINS, K. Biochemical properties of *Trypanosoma cruzi* telomerase. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 17, p. 5214-5222, 2004.

MUTOMBA, M. C. et al. Inhibition of proteasome activity blocks cell cycle progression at specific phase boundaries in African trypanosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 90, n. 2, p. 491-504, 1997.

NAKADA, D. et al. The ATM-related Tel1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* controls a checkpoint response following phleomycin treatment. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 6, p. 1715-1724, 2003.

NETO, J. L. et al. *Leishmania* replication protein A-1 binds in vivo single-stranded telomeric DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, n. 2, p. 417-423, 2007.

OAKLEY, G. G.; PATRICK, Steve M. Replication protein A: directing traffic at the intersection of replication and repair. **Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual library**, v. 15, p. 883, 2010.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. 2006.

PALM, W.; DE LANGE, T. How shelterin protects mammalian telomeres. **Annual Review of Genetics**, v. 42, p. 301-334, 2008.

PANDYA, U. M.; SANDHU, R.; LI, B. Silencing subtelomeric VSGs by *Trypanosoma brucei* RAP1 at the insect stage involves chromatin structure changes. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 16, p. 7673-7682, 2013.

PARKER, A. et al. Human homolog of the MutY repair protein (hMYH) physically interacts with proteins involved in long patch DNA base excision repair. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 8, p. 5547-5555, 2001.

PASSOS-SILVA, D. G. et al. Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2010, 2010.

POVELONES, M. L. et al. Histone H1 plays a role in heterochromatin formation and VSG expression site silencing in *Trypanosoma brucei*. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 11, p. e1003010, 2012.

PRICE, C. M. et al. Evolution of CST function in telomere maintenance. **Cell Cycle**, v. 9, n. 16, p. 3157, 2010.

QURESHI, M. H. et al. Replication protein A unfolds G-quadruplex structures with varying degrees of efficiency. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 19, p. 5588-5594, 2012.

RAMILO, C. et al. Partial reconstitution of human DNA mismatch repair in vitro: characterization of the role of human replication protein A. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 7, p. 2037-2046, 2002.

RAY, S. et al. G-quadruplex formation in telomeres enhances POT1/TPP1 protection against RPA binding. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 8, p. 2990-2995, 2014.

RUBTSOVA, M. P. et al. Replication protein A modulates the activity of human telomerase in vitro. **Biochemistry (Moscow)**, v. 74, n. 1, p. 92-96, 2009.

SCHENKMAN, S. et al. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 499-523, 1994.

SCHRAMKE, V. et al. RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends. **Nature Genetics**, v. 36, n. 1, p. 46-54, 2004.

SREERAMA, N.; WOODY, Robert W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252-260, 2000.

SMITH, J.; ZOU, H.; ROTHSTEIN, R. Characterization of genetic interactions with RFA1: the role of RPA in DNA replication and telomere maintenance. **Biochimie**, v. 82, n. 1, p. 71-78, 2000.

SMOGORZEWSKA, A.; DE LANGE, Titia. Regulation of telomerase by telomeric proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 177-208, 2004.

STAUFFER, M. E.; CHAZIN, W. J. Physical interaction between replication protein A and Rad51 promotes exchange on single-stranded DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 24, p. 25638-25645, 2004.

STEWART, J. A. et al. Human CST promotes telomere duplex replication and general replication restart after fork stalling. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 17, p. 3537-3549, 2012.

SUN, J. et al. Stn1–Ten1 is an Rpa2–Rpa3-like complex at telomeres. **Genes & Development**, v. 23, n. 24, p. 2900-2914, 2009.

SUN, J. et al. Structural bases of dimerization of yeast telomere protein Cdc13 and its interaction with the catalytic subunit of DNA polymerase  $\alpha$ . **Cell Research**, v. 21, n. 2, p. 258-274, 2011.

SUROVTSEVA, Y. V. et al. Conserved telomere maintenance component 1 interacts with STN1 and maintains chromosome ends in higher eukaryotes. **Molecular Cell**, v. 36, n. 2, p. 207-218, 2009.

TEIXEIRA, M. T. *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study replicative senescence triggered by telomere shortening. **Frontiers in Oncology**, v. 3, 2013.

TEJERA, A. M. et al. TPP1 is required for TERT recruitment, telomere elongation during nuclear reprogramming, and normal skin development in mice. **Developmental Cell**, v. 18, n. 5, p. 775-789, 2010.

TSAALBI-SHTYLIK, A. et al. Persistently stalled replication forks inhibit nucleotide excision repair in trans by sequestering Replication protein A. **Nucleic Acids Research**, p. gkt1412, 2014.

VAN LUENEN, H. G. A. M et al. Glucosylated Hydroxymethyluracil, DNA Base J, Prevents Transcriptional Readthrough in *Leishmania*. **Cell**, v. 150, n. 5, p. 909-921, 2012.

VASSIN, V. M.; WOLD, Marc S.; BOROWIEC, James A. Replication protein A (RPA) phosphorylation prevents RPA association with replication centers. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 5, p. 1930-1943, 2004.

VERDUN, R. E.; KARLSEDER, Jan. The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 709-720, 2006.

WAGA, S.; STILLMAN, B. Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication in vitro. 1994.

WELLINGER, R. J.; WOLF, A. J.; ZAKIAN, V. A. *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG<sub>1–3</sub> tails late in S phase. **Cell**, v. 72, n. 1, p. 51-60, 1993.

WHO (World Health Organization), (2010). Chagas Disease (American Trypanosomiasis) <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> acesso em: 20 agosto 2011

WHO (World Health Organization), (1991). Control of Chagas Disease. WHO Technical Report Series 811. Geneva: WHO.

WOLD, M. S.; KELLY, T. Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 8, p. 2523-2527, 1988.

WOLD, M. S. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 66, n. 1, p. 61-92, 1997.

WU, L. et al. *Pot1* Deficiency Initiates DNA Damage Checkpoint Activation and Aberrant Homologous Recombination at Telomeres. **Cell**, v. 126, n. 1, p. 49-62, 2006.

WU, X.; SHELL, S. M.; ZOU, Y. Interaction and colocalization of Rad9/Rad1/Hus1 checkpoint complex with replication protein A in human cells. **Oncogene**, v. 24, n. 29, p. 4728-4735, 2005.

WU, P.; TAKAI, H.; DE LANGE, T. Telomeric 3' overhangs derive from resection by Exo1 and Apollo and fill-in by POT1b-associated CST. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 39-52, 2012.

XIN, H. et al. TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-*1* and interacts with POT1 to recruit telomerase. **Nature**, v. 445, n. 7127, p. 559-562, 2007.

XU, X. et al. The basic cleft of RPA70N binds multiple checkpoint proteins, including RAD9, to regulate ATR signaling. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 24, p. 7345-7353, 2008.


YAJIMA, H. et al. The complexity of DNA double strand breaks is a critical factor enhancing end-resection. **DNA Repair**, v. 12, n. 11, p. 936-946, 2013.

YANG, X. et al. RAP1 Is Essential for Silencing Telomeric Variant Surface Glycoprotein Genes in *Trypanosoma brucei*. **Cell**, v. 137, n. 1, p. 99-109, 2009.

YE, J. Z. S. et al. TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 45, p. 47264-47271, 2004.

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: How the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitology International**, v. 57, n. 2, p. 105-109, 2008.

## ANEXO – Certificados de prêmios em Congressos



Inclusion of Nations in Science


# 11<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens

XI Congress of SBMCTA and IX Congress of ALAMCTA  
03 to 08 November 2013 - Bourbon Cataratas Convention & Spa Resort - Foz do Iguaçu, PR, BRAZIL


## CERTIFICATE

The SBMCTA and the IAEMS congratulate you for your poster presentation at the *11th International Conference on Environmental Mutagens* held in Foz do Iguaçu, Brazil on November 3 - 8, 2013. We are pleased to communicate that your work has been selected for the "MUTAGENESIS AWARD – NIH".  
Congratulations!


**MUTAGENESIS AWARD – NIH conferred to *Raphael Souza Pavan* for the presentation of the work  
"REPAIR OF TELOMERES: INVOLVEMENT OF RPA-1 IN TRYPANASTIGOTE LIFEFORM OF TRYPANOSSOMA CRUZI"**



Carlos F. M. Menck  
Chair of the 11th ICEM



Stefano Bonassi  
President of IAEMS



# XV Reunião Científica Anual do Instituto Butantan - 2013

## Internacionalização da Ciência Brasileira: Caminhos e Desafios para o Instituto Butantan

Certificamos que o trabalho "Blockage of DNA replication in *T. cruzi*: a possible role for RPA-1-telomere interaction" de autoria de Pavaní RS, Pariona-Llanos R, Sant'Anna OA, Cano MIN, Elias MC foi o vencedor do Prêmio Jovem Cientista na Modalidade Mestrado na XV Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, de 4 a 6 dezembro de 2013, no Instituto Butantan, São Paulo, SP.



Gisele Picolo  
Presidente da Comissão Organizadora



Yara Cury  
Diretora da Divisão de  
Desenvolvimento Científico

