

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

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 eucariotos compreende um heterotrímero, 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 eucariotos 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 trímero 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. Ensaios de dicroísmo 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 eucariotos, 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.

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).

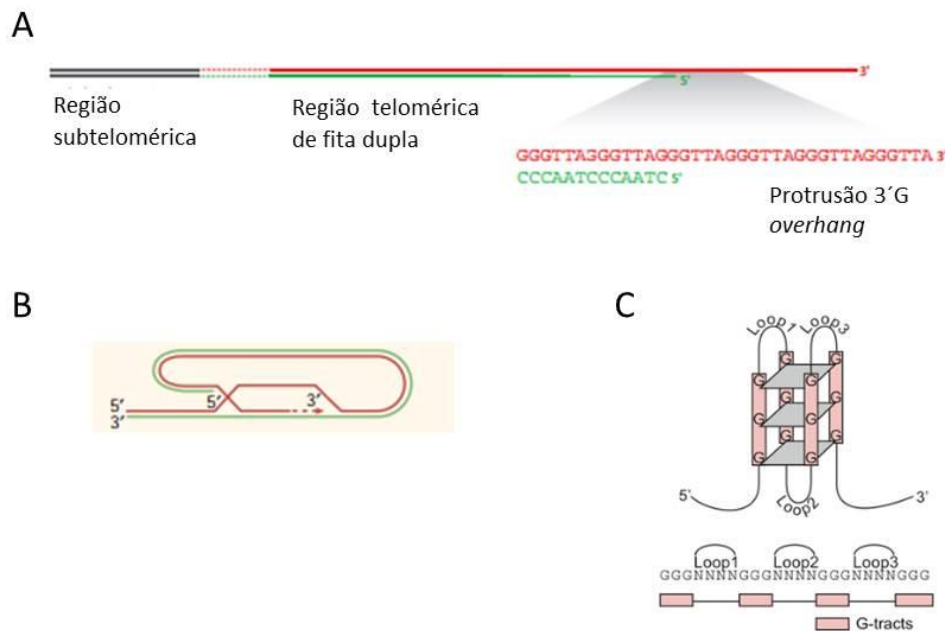


Figura 1.1- Estrutura do DNA telomérico e possíveis estruturas secundárias formadas.

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

quebra de dupla fita e no auxílio no controle do recrutamento e do término da atividade da telomerase (CHEN; REDON; LINGNER, 2012; LIU et al., 2014; LONGHESE, 2008; LATRICK; CECH, 2010).

O complexo de proteínas que interage com os telômeros varia entre os diferentes organismos, como mostrado na figura 1.2 (MARTINEZ; BLASCO, 2011; PALM; DE LANGE, 2008). Ao longo deste tópico, focaremos nas proteínas que interagem com o *overhang* telomérico, que possuem maior importância para o entendimento do trabalho. Estas proteínas interagem com o DNA telomérico via seus domínios Ob-fold, que consistem em um arranjo de folhas β formando uma estrutura de β -barril que se envolve em torno do DNA simples fita (BOCHKAREV; BOCHKAREVA, 2004; LOAYZA et al., 2004)) e compartilham a característica de possuir afinidade pela fita G telomérica. As semelhanças estruturais e organização dos domínios Ob-fold destas proteínas classificam-nas como RPA-*like*, devido a similaridades em relação ao complexo RPA ou a algum de seus componentes (GAO et al., 2007; GIRAUD-PANIS et al., 2010; MYIAKE et al., 2009; PRICE et al., 2010; SUN et al., 2009).

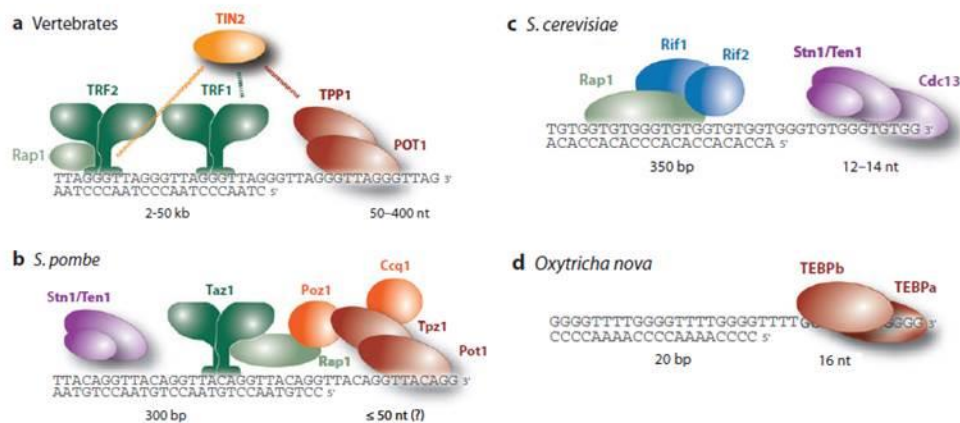


Figura 1.2- Proteínas interatoras dos telômeros em diferentes organismos.
 Proteínas constitutivas dos telômeros nos diferentes organismo (PALM; DE LANGE, 2008)

Os telômeros de mamíferos e leveduras são os mais bem estudados. Em mamíferos, foi descrito um complexo de proteínas nomeado *shelterin* (Shelter = escudo) que é responsável pela proteção e estabilidade da região telomérica (DE LANGE, 2005, PALM; DE LANGE, 2008). Esse complexo é composto por proteínas que interagem com a dupla fita telomérica, TRF-1, TRF-2 e RAP-1, proteínas que interagem com a simples fita telomérica POT1 e sua interatora TPP1 (forma um

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 α a STN1, sugerindo que este complexo é essencial para a manutenção telomérica nestas células (GU et al., 2013).

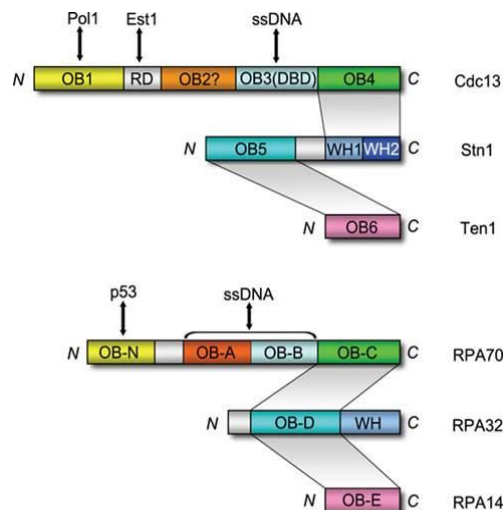


Figura 1.3 Semelhança de organização de domínios dos complexos CST e RPA.

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)

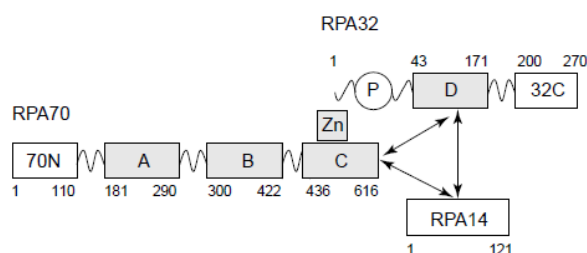


Figura 1.4 Organização estrutural de domínios do complexo RPA.

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.

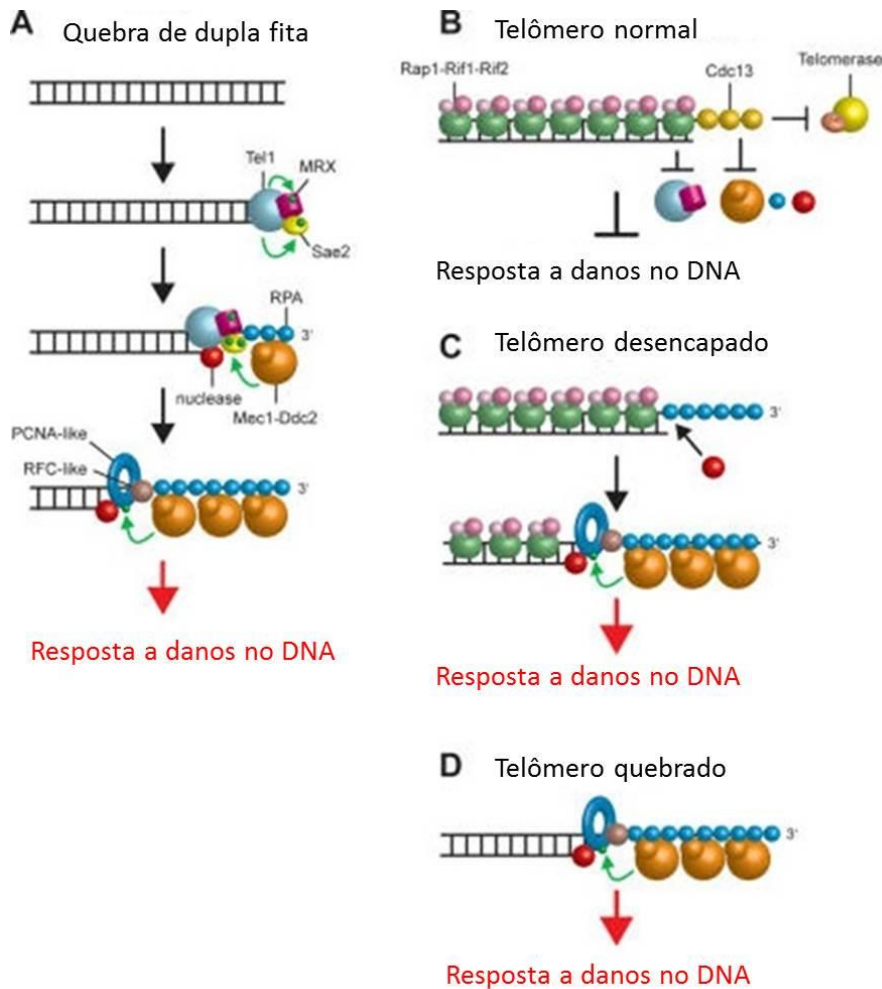


Figura 1.5 - Envolvimento da proteína RPA em resposta a quebra de dupla fita de DNA e danos no telômero

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 sanguínea 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.

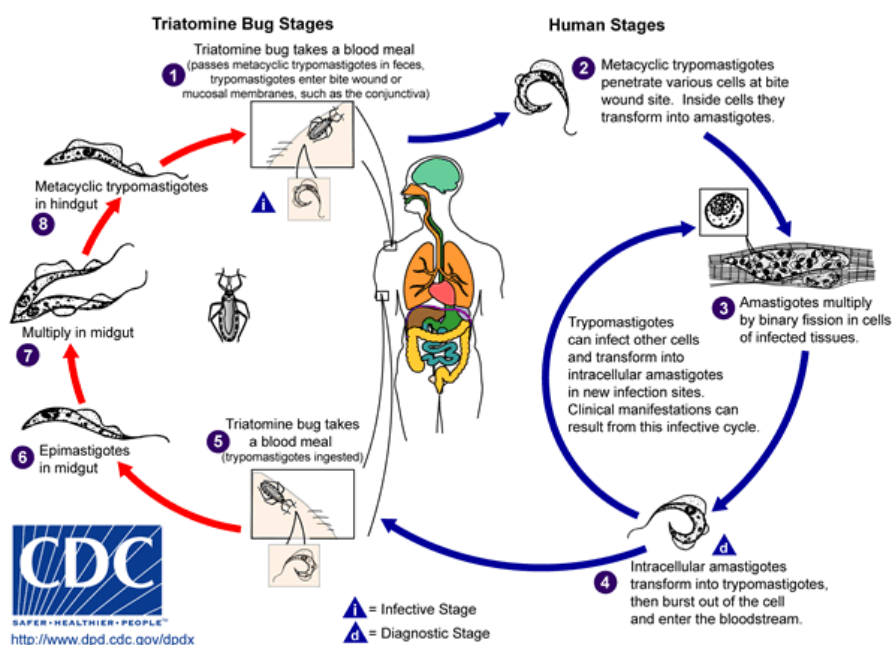


Figura 1.6 Ciclo de vida de *T. cruzi*
(Center for Disease Control and Prevention, CDC, 2011).

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 (interator 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*).

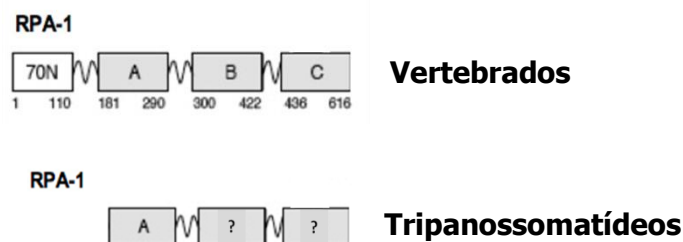


Figura 1.7 - Estrutura da proteína RPA-1 de tripanossomatídeos

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.

3 CONCLUSÃO

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 proteica 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 α , 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. β -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} CIP1^{sup}, but Not p16^{sup} INK4a^{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 α . **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_{1–3} 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.