UNIVERSIDAD DE SAO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRAO PRETO
RICARDO OBONAGA GÓMEZ

**A deficiência das proteínas de *checkpoint* HUS1 e
RAD9 promove a variação do número de cópias no
genoma de *Leishmania major***

Ribeirao Preto-SP

2017

RICARDO OBONAGA GÓMEZ

**A deficiência das proteínas de *checkpoint* HUS1 e
RAD9 promove a variação do número de cópias no
genoma de *Leishmania major*.**

Tese apresentada a Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em
Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi

Ribeirao Preto-SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa desde que citada a fonte.

Obonaga, Gomez Ricardo

A deficiência das proteínas de *checkpoint* Hus1 e Rad9 promove a variação do número de cópias no genoma de *Leishmania major* / Ricardo Obonaga Gómez; Orientador: Tosi, Luiz Ricardo Orsini- Ribeirão Preto, 2017.

Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Descritores: 1. *Leishmania* 2. Tripanosomatídeos 3. Complexo 9-1-1 4. RAD9 5. HUS1 6. RAD1 7. Plasticidade genômica 8. Instabilidade genômica 9. Detecção de danos no DNA 10. Variação do número de cópias 11. Aneuploidia 12. DHFR-TS 13. Amplificação gênica 14. ssDNA 15. γ H2A

O BONAGA, Gómez Ricardo. **A deficiência das proteínas de *checkpoint* HUS1 e RAD9 promove a variação do número de cópias no genoma de *Leishmania major***. Tese apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Aprovado em: _____ / _____ / _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

**A minha mãe Miriam e meu irmão Levy Dononovan pelo amor incondicional,
pela confiança, apoio e sabedoria.**

**A minha família, especialmente Rosa e Yesid (sem desconhecer o amor dos
demais) pelo amor, confiança, estímulo, conhecimento e sabedoria que me
impulsam a continuar crescendo cada dia.**

A minha grande companheira Laís, pelo seu amor, paciência e bondade.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo O. Tosi pela orientação, amizade, confiança, disponibilidade, conhecimento e pelo constante estímulo.

A Profa. Dra Angela Kaysel Cruz pela amizade, confiança, disponibilidade e pela utilização do laboratório para o desenvolvimento de alguns experimentos o utilização de seus equipamentos.

A Jeziel, pela confiança e as grandes contribuições a meu trabalho

A Elaine pela amizade, confiança e pelo convívio diário.

Aos membros do laboratório da Profa. Dra Angela Kaysel Cruz pela amizade e colaboração.

A Tânia e a Viviane pela amizade e grande colaboração

As secretarias, principalmente a Gabriela pela colaboração, disponibilidade e paciência.

A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos

A Roberta pela amizade, colaboração e ajuda no microscópio multifotón

APOIO

Este trabalho foi realizado com apoio do:

**Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos
da faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP).**

Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular.

**A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES).**

**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
(CNPq) pelo programa SWE mediante o processo 132367/2013-0.**

**Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo FAPESP
(Proc. 14/06824-9).**

ÍNDICE

RESUMO	11
INTRODUÇÃO	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 <i>Leishmania</i> e leishmanioses.....	17
1.1.1 Manifestações Clínicas.....	17
1.1.2 Epidemiologia	17
1.1.3. Ciclo de Vida.....	18
1.1.4. Determinantes da doença	18
1.2. Organização do genoma de <i>Leishmania</i>	22
1.3. Variação do número de cópias do DNA	24
1.4. Modelos de variação no número de cópias	28
1.5. Variação do número de cópias dos cromossomos e mosaicismo de ploidia	29
1.6. Estabilidade Genômica nas Celulas Eucariotas	34
1.7. Via de activação da quinase ATR.....	35
1.8. Funções da ATR na sinalização de <i>checkpoint</i>	36
1.8.1 Parada do ciclo celular	36
1.8.2. Regulação das origens de replicação	38
1.8.3. Inibição do colapso da forquilha dependente de nucleases	38
1.8.4. Controle da função do replisoma.....	38
1.8.5. Outras funções da ATR associadas à sinalização de <i>checkpoint</i>	38
1.9. O complexo Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1).....	39
1.10. Detecção e sinalização de DSBs por ATM.....	45
1.11. Mudança da detecção e sinalização de ATM para ATR na quebra do DNA	46
1.12. Possível função do complexo 911 na plasticidade genômica	46
MATERIAIS E MÉTODOS	49
2. MATERIAIS E MÉTODOS	50
2.1. Cultivo de Formas Promastigotas.....	50
2.2. Geração de Linhagens Resistentes a MTX.....	50
2.3. Contagem das Formas Promastigotes e Curvas de Crescimento	51
2.4. Obtenção de Extratos de Proteínas Totais.....	51
2.5. Western Blotting.....	51
2.6. Eletroforese do DNA em Gel de Agarose.....	52
2.7. Preparação das Amostras para Eletroforese em Gel em Campo Pulsado (<i>Pulsed field gel electrophoresis</i> , PFGE)	53
2.8. Separação dos Cromossomos por Eletroforese em Gel em Campo Pulsado (<i>Pulsed field gel electrophoresis</i> , PFGE).....	53
2.9. Southern Blotting	54
2.10. Geração dos Fragmentos de DNA para Serem Usados como Sondas no <i>Southern Blotting</i>	54
2.11. Detecção do Número de Cópias dos Genes da <i>DHFR-TS</i> e <i>PTR1</i> por PCR Quantitativa	55

2.12. Detecção da Incorporação de IdU em Células na Fase de Síntese do DNA Mediante Citometria de Fluxo	56
2.13. Identificação do DNA de Fita Simples (<i>single strand DNA</i> , <i>ssDNA</i>) por Citometria de Fluxo: Detecção da Incorporação de IdU em Condições Não Desnaturantes	57
2.14. Detecção da γ H2A por Citometria de Fluxo	58
2.15. Instrumentação e Análises dos Dados da Citometria de Fluxo.....	58
2.15.1. Identificação de células na fase S	59
2.15.2. Identificação de células com DNA de fita simples.....	60
2.15.2. Identificação de células com γ H2A.....	61
2.16. Separação de Células Activadas pela Fluorescência e Preparo das Amostras para Sequenciamento.....	61
2.17. Análise de <i>Read Depth</i> para a Detecção da Variação do Número dos Cromossomos.....	62
2.18. Análises Estatísticas	63
RESULTADOS	64
3. RESULTADOS	65
3.1. Seleção da Linhagem WT e Linhagens Celulares Deficientes das Proteínas Hus1 ou Rad9 para Resistência ao MTX	65
3.2. Análise do Crescimento Celular das Linhagens Resistentes ao MTX Previamente Expostas ou Não a HU	67
3.3. Análise dos Níveis de Expressão das Proteínas Hus1 e Rad9 nas Linhagens Resistentes ao MTX Derivadas das Linhagens Hus1+/- e Rad9+/-	70
3.4. Quantificação do Número de Cópias da <i>DHFR-TS</i> e <i>PTR1</i> das Linhagens Resistentes ao MTX	72
3.5. Quantificação do Número de Cópias da <i>DHFR-TS</i> das Linhagens Resistentes ao MTX Previamente Expostas a CPT	76
3.6. Caracterização da Natureza das Amplificações das Linhagens Seleccionadas em MTX Expostas ou Não a HU	78
3.7. Caracterização da Natureza das Amplificações das Linhagens Seleccionadas em MTX Previamente Expostas a CPT	85
3.8. Análise do Efeito da Deficiência das Proteínas Hus1 e Rad9 na Síntese do DNA.....	88
3.8.1. Análise de Perfil e de Progressão no Ciclo Celular das Células Incubadas com IdU Antes e Após do Bloqueio com 10 mM de HU por 8h.....	88
3.8.2. Análise Comparativa das Células na Fase S no Gráfico Bivariado da Incorporação do IdU e Conteúdo do DNA	90
3.8.3. Análise Comparativa da Porcentagem de Células na Fase S Entre a Linhagem WT e Linhagens Deficientes das Proteínas Hus1 ou Rad9.....	93
3.8.4. Análise Comparativa do Processo de Replicação a partir da Quantificação da Intensidade da Fluorescência das Células na Fase S que Incorporaram o IdU.....	95
3.8.5. Análise Comparativa das Células em <i>Early S</i> , <i>Middle S</i> e <i>Late S</i>	98
3.9. Análise do Efeito da Deficiência das Proteínas Hus1 e Rad9 na Formação de Simples Fita do DNA.....	102
3.9.1. Análise do Ciclo Celular e Progressão em Resposta ao Estresse de Replicação com 10mM de HU por 15h	103
3.9.2. Análise Comparativa das Células com <i>ssDNA</i> no Gráfico Bivariado do Conteúdo do DNA Versus Incorporação do IdU	105
3.9.3. Análise Comparativa da Porcentagem de Células com <i>ssDNA</i> Total.....	106
3.9.4. Análise Comparativa das Células com <i>ssDNA</i> na Fase G1, S e G2/M do Ciclo Celular	110

3.10. Análise da Deficiência das Proteínas Hus1 e Rad9 na Sinalização do Dano do DNA	115
3.10.1. Análise Comparativa das Células com Dano no DNA no Gráfico Bivariado do Conteúdo do DNA Versus γ H2A	116
3.10.2. Análise Comparativa da Porcentagem de Células com γ H2A	116
3.10.3. Análise Comparativa das Células positivas para γ H2A na Fase G1, S e G2/M do Ciclo Celular	121
3.11. Análise da Deficiência das Proteínas Hus1 ou Rad9 na Variação do Número dos Cromossomos	125
DISCUSSÃO	128
4. Discussão	129
APÊNDICE	139
6. REFERENCIAS	142

RESUMO

O BONAGA, G. R. **A deficiência das proteínas de checkpoint HUS1 e RAD9 promove variação do número de cópias no genoma de *Leishmania major***. 2017. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A variação do número de cópias (CNV) de genes e cromossomos é uma característica comum do genoma plástico de *Leishmania major*, que pode estar associada à resistência do parasita à quimioterapia das leishmanioses. Em outros eucariotos, alterações na replicação do DNA ou na resposta a danos no DNA (DDR) pode levar à CNV. Nestes organismos, o complexo de *checkpoint* 9-1-1 (RAD9, RAD1 e HUS1) é essencial para a detecção e a sinalização do estresse de replicação e para o recrutamento de uma apropriada DDR. Já demonstramos que *L. major* expressa um homólogo 9-1-1 funcional. Aqui, avaliamos a deficiência de subunidades de 9-1-1 na variação do número de cópias em células selecionadas em metotrexato (MTX), um inibidor da enzima diidrofolato redutase timidilato sintetase (DHFR-TS). A seleção em MTX facilita o isolamento de células que carregam amplificações contendo o locus da *DHFR-TS*. Assim, selecionamos células deficientes de HUS1 ou RAD9 para resistência ao MTX sem e com exposição previa a hidroxiureia (HU), uma droga que causa estresse de replicação por inibição da ribonucleotídeo redutase, e avaliamos o efeito da deficiência destas proteínas na CNV e no tipo de amplificação gerada. Avaliamos também o efeito da deficiência destas proteínas no processo de síntese do DNA medido pela incorporação de IdU e observamos que a deficiência destas proteínas levou a um incremento na síntese do DNA na ausência de estresse de replicação e a perfis opostos de síntese do DNA após a remoção do estresse replicativo. Análises da detecção de simples fita do DNA (ssDNA) e da histona H2A fosforilada (γ H2A) como indicadores do processo de estresse de replicação e dano no DNA também foram conduzidas. Em conjunto, nossos resultados indicam que (i) os níveis alterados das proteínas HUS1 e RAD9 afetam o padrão da CNV após a seleção no MTX, assim como a natureza da amplificação; (ii) HUS1 e RAD9 parecem possuir mecanismos distintos para mediar a CNV; (iii) a função destas proteínas na CNV deve envolver o processo de replicação e (iv) HUS1 e RAD9 são requeridas para a

manutenção da estabilidade genômica em *Leishmania*. Estes resultados contribuem para uma melhor compreensão não só da evolução da via de sinalização mediada pelo complexo de *checkpoint* 9-1-1 nos eucariotos, mas também da bases moleculares da plasticidade genômica e do fenômeno de amplificação gênica em *Leishmania*.

Palavras chaves: *Leishmania*, tripanosomatídeos complexo 9-1-1, RAD9, HUS1, RAD1, plasticidade genômica, instabilidade genômica, variação do número de cópias, aneuploidia, DHFR-TS, amplificação gênica, ssDNA, γ H2A.

SUMMARY

OBONAGA, G. R. **Deficiency of checkpoint proteins HUS1 and RAD9 promotes copy number variation in the *Leishmania major* genome**. 2017. Thesis (Doctorate) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo – USP.

The copy number variation (CNV) of genes and chromosomes is a common feature of the plastic genome of *Leishmania major*, which is normally associated with resistance of the parasite to the chemotherapy of leishmaniasis. In other eukaryotes, alteration in DNA replication and DNA damage response (DDR) causes CNV. In these organisms, the RAD9-RAD1-HUS1 (9-1-1) checkpoint complex is essential for detection and signaling of replication stress and recruitment of an appropriate DDR. We have already demonstrated that *L. major* expresses a functional 9-1-1 homolog. Here we evaluated the effect of 9-1-1 subunit deficiency in CNV of cells selected in methotrexate (MTX), an inhibitor of the dihydrofolate reductase thymidylate synthetase (DHFR-TS) enzyme. Selection in MTX facilitates the isolation of cells that carry amplicons containing the *DHFR-TS* locus. Thus, we selected HUS1 or RAD9 deficient cells for MTX resistance without and prior exposure to hydroxyurea (HU), a drug that causes replication stress due to inhibition of ribonucleotide reductase, and evaluated not only CNV, but also the nature of the amplification generated. We also evaluated the effect of deficiency of these proteins in the DNA synthesis process measured by IdU incorporation and observed that the deficiency of these proteins led to an increase in DNA synthesis in the absence of replication stress, and to opposite profiles of DNA synthesis after removal of replicative stress. Analyzes of single-stranded DNA (ssDNA) and phosphorylated histone H2A (γ H2A) as indicators of replication stress and DNA damage were also conducted in both presence and absence of replicative stress. Taken together, our results indicate that (i) altered levels of HUS1 and RAD9 proteins affect the CNV pattern after selection in MTX, as well as the nature of amplification; (ii) HUS1 and RAD9 possibly have different mechanisms to mediate CNV; (iii) the function of these proteins in CNV seems to involve replication process and (iv) HUS1 and RAD9 are required for the maintenance of genomic stability in *Leishmania*. These findings contribute to a better understanding not only of the evolution of the signaling pathway mediated by 9-1-1 checkpoint complex in eukaryotes, but also of the molecular basis of the genome plasticity and the gene amplification phenomenon in *Leishmania*.

Key words: *Leishmania*, trypanosomatids, 9-1-1 complex, RAD9, HUS1, RAD1, genomic plasticity, genomic instability, copy number variation, aneuploidy, DHFR- TS, gene amplification, ssDNA, γ H2A.

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

MTX Metotrexato

DHFR-TS dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (Dihidrofolato redutase timidilato sintase)

PTR1 Pteridine reductase 1 (Pteridina redutase 1)

CPT - Camptotecina

HU - Hidroxiuréia

DNA – Deoxiribonucleic Acid (Ácido Deoxirribonucleico)

ssDNA – single strand DNA (DNA de simples fita)

DSB- Double-strand breaks (quebra de dupla fita)

°C – grau celsius

BSA – Bovin Serum Albumin (Soro-albumina Bovina)

kb - kilobases

h - hora

mg - miligrama

min - minuto

mL - mililitro

mM - milimolar

PBS - Phosphate Buffered Saline (Solução Salina Tamponada com Fosfato

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da DNA Polimerase)

qPCR – Quantitative Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da DNA Polimerase Quantitativa)

SDS-PAGE - Polyacrylamide Gel Electrophoresis with SDS (Eltroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS)

seg - segundos

V - volt

WT – Wild Type (linhagem de célula do tipo selvagem)

µg - microcragama

µL - microlitro

µM - micromolar

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Leishmania* e Leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários parasitas de mais de 20 espécies de *Leishmania*, os quais são transmitidos aos seres humanos pela picada de dípteros do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*. Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose é uma das sete doenças tropicais mais importantes, e representa um grave problema de saúde mundial, apresentando um amplo espectro de manifestações clínicas (*World Health Organization, WHO*).

1.1.1 Manifestações Clínicas

As quatro formas principais de leishmanioses são a forma cutânea, na qual os parasitas permanecem no sítio de infecção e causam úlcera localizada a longo prazo; a forma mucocutânea, que causa destruição crônica do tecido mucoso desenvolvendo-se a partir da doença cutânea em menos de 5% dos indivíduos afetados; a forma cutânea difusa, a qual causa lesões cutâneas disseminadas e crônicas que se assemelham à da lepra lepromatosa; e a forma visceral ou kala-azar, que é a manifestação mais severa na qual os parasitas deixam o sítio de inoculação e proliferam no fígado, baço e medula óssea, levando a imunossupressão e morte na ausência de tratamento (WHO).

1.1.2 Epidemiologia

As leishmanioses apresentam distribuição mundial afetando pessoas na Ásia, África, Américas e na região mediterrânea, onde é endêmica em 97 países (WHO). Entre 12 e 15 milhões de pessoas no mundo estão infectadas, e 350 milhões estão no risco de adquirir a doença. Estima-se que 1,5 a 2,0 milhões de novos casos acontecem a cada ano, causando 70,000 mortes anuais. Em 2015, 90% dos casos de leishmanioses visceral a nível global foram relatados no Brasil, Etiópia, Quênia, Somália e Sudão (WHO) (Figura 1A). Os 10 países com o maior número de casos de leishmanioses cutânea relatados nesse mesmo ano foram Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Peru, República Árabe Síria, Tunísia e Iêmen, que juntos representam 87% da incidência de leishmanioses cutânea registrada globalmente (WHO) (Figura 1B).

1.1.3. Ciclo de Vida

Leishmania tem um ciclo de vida digenético alternando entre um hospedeiro vertebrado/mamífero e insetos vetores flebotomíneos (Harhay, Olliaro et al. 2011, Kaye and Scott 2011). Este ciclo de vida envolve duas formas do parasita, uma forma promastigota, que é alongada e dotada de flagelo, e a forma amastigota, redonda com flagelo não desenvolvido (Figura 2). As formas promastigotas metacíclicas são inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado/mamífero durante a ingestão de sangue pelas fêmeas de flebotomíneos infectadas. Estas formas metacíclicas são logo fagocitadas pelas células do sistema imunológico como os macrófagos, e neste ambiente intracelular do macrófago se diferenciam em amastigotas. A multiplicação das formas amastigotas causa o rompimento dos macrófagos e a fagocitose dos amastigotas liberados por novos macrófagos. Se um inseto ingere sangue de um hospedeiro vertebrado/mamífero previamente infectado, os macrófagos que albergam amastigotas também serão ingeridos. No trato digestivo do inseto as formas amastigotas vão se diferenciar em promastigotas e depois em promastigotas metacíclicas, as quais vão migrar para o aparelho bucal do inseto e poderão ser inoculadas no próximo hospedeiro vertebrado/mamífero (Figura 3).

1.1.4. Determinantes da Doença

As diversas manifestações clínicas das leishmanioses são o resultado de características do hospedeiro, do vetor e do parasita (McCall, Zhang et al. 2013). Entre as características do hospedeiro que influenciam o desenvolvimento da doença está a sua base genética (Lipoldova and Demant 2006, Jeronimo, Duggal et al. 2007) e características adquiridas associadas com uma resposta imune comprometida (Dye and Williams 1993, Desjeux and Alvar 2003). Entre os determinantes do vetor, se tem observado que a saliva dos mosquitos de regiões endêmicas de leishmaniose visceral causa mais vasodilatação que os vetores coletados de uma região endêmica de leishmaniose cutânea (Warburg, Saraiva et al. 1994), sugerindo que a vasodilatação promove um melhor acesso do parasita aos órgãos viscerais, e que a espécie do vetor pode influenciar o desenvolvimento da doença. O tamanho do inóculo transmitido pelo vetor pode também influenciar o resultado da doença (Maia, Seblova et al. 2011).

A

Situação de endemidade das leishmanioses visceral no nível mundial, 2015

B

Situação de endemidade das leishmanioses cutânea no nível mundial, 2015

Figura 1. Situação epidemiológica da leishmaniose cutânea e visceral no nível mundial reportada no 2015. A) Situação epidemiológica da leishmaniose cutânea. **B)** Situação epidemiológica da leishmaniose visceral. As figuras foram modificadas a partir das figuras previas disponíveis no sítio web da Organização Mundial da Saude, OMS. (<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>). Fonte ano 2017.

Figura 2. Principais formas evolutivas da *Leishmania* durante seu ciclo de vida. A figura mostra a representação esquemática das formas promastigota (esquerda) e amastigota (direita) da *Leishmania* e as principais organelas celulares encontradas em cada uma delas. A localização da da bolsa flagelar indica a porção anterior nas duas formas celulares. Esta figura foi gerada a partir de figura previamente publicada (Besteiro, Williams et al. 2007).

Figura 3. Ciclo de vida do gênero *Leishmania*. Nos insetos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, as amastigotas se transformam em promastigotas, se desenvolvem no intestino médio e migram para a probóscide onde são injetadas por fêmeas nos hospedeiros de mamíferos silvestres, humanos ou vertebrados durante uma refeição de sangue. No local da mordida, Os promastigotes são fagocitados por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas. Os promastigotes então se transformam dentro dessas células em amastigotas, que se multiplicam por simples divisão e procedem a infectar outras células fagocíticas mononucleares. Os fatores relacionados às espécies do parasitas e ao hospedeiro determinam se a infecção torna-se sintomática e resulta na leishmaniose cutânea ou visceral. Esta figura foi modificada a partir da figura previamente publicada (Harhay, Olliaro et al. 2011).

Uma dose infectiva grande pode promover uma resposta imune local forte que limita a disseminação e impede a invasão aos órgãos viscerais. No entanto, apesar de que as características do vetor e do hospedeiro podem influenciar a progressão à doença sintomática, as características dos parasitas são os determinantes mais importantes que distinguem a doença cutânea da visceral.

Se tem demonstrado que as diferenças em genes específicos, polimorfismos de genes, pseudogenes e expressão de genes de virulência e de resposta ao estresse, podem contribuir para a patologia da doença. Um exemplo de genes que são requeridos para a visceralização do parasito é a família do gene A2, os quais são expressos em *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, enquanto que são pseudogenes em algumas espécies cutâneas como *L. major* e *Leishmania tropica* (Charest and Matlashewski 1994, Ghedin, Zhang et al. 1997). A desregulação destes genes tem resultado numa diminuição da carga parasitária nos órgãos viscerais (Zhang and Matlashewski 2001). Contrariamente, a introdução dos genes A2 em *L. major* aumenta a habilidade das células infectadas para migrar fora da derme e incrementar a sobrevivência nos órgãos viscerais (Zhang, Mendez et al. 2003). No entanto, embora a transfecção destes genes específicos de *L. donovani* em *L. major* incremente a sobrevivência nos órgãos viscerais, nenhum deles é capaz de restaurar completamente a virulência de *L. major* no mesmo nível de *L. donovani*, sugerindo que além dos genes específicos de *L. donovani*, outros fatores como a amplificação gênica, polimorfismos e diferenças na regulação pós-transcrição são importantes nas diferentes manifestações clínicas (Zhang and Matlashewski 2010).

1.2. Organização do Genoma de *Leishmania*

O genoma de *Leishmania* é de aproximadamente 32 Mb, mostrando quase 8300 genes que codificam para proteínas (Ivens, Peacock et al. 2005). As diferentes espécies que compõem este gênero apresentam entre 34 e 36 cromossomos que vão desde 0,3 até 2,8 Mb, com 36 cromossomos para as espécies de *Leishmania* do velho mundo e de 34 a 35 cromossomos para as espécies de *Leishmania* do novo mundo. Dentro deste gênero se tem encontrado também uma sintonia conservada de 99 % entre as espécies de *L. major*, *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* (Peacock, Seeger et al. 2007). Na *Leishmania mexicana* os cromossomos 8 e 29, e os cromossomos 20 e 36 são fusionados, enquanto que na *L. braziliensis* a fusão acontece entre os cromossomos 20 e 34 (Britto, Ravel et al. 1998).

Semelhante a outros cinetoplastídeos, o gênero *Leishmania* apresenta uma organização única no seu genoma com genes sem íntrons e distribuídos em grandes unidades policistrônicas nas duas fitas do DNA (Martinez-Calvillo, Yan et al. 2003, El-Sayed, Myler et al. 2005), uma característica que assemelha aos organismos procariontes. Os genes são organizados em aproximadamente 133 grupos de genes direcionais ao longo de seus 36 cromossomos, contendo entre dez e centos de genes que codificam proteínas na mesma fita do DNA (Ivens, Peacock et al. 2005, Daniels, Gull et al. 2010, Tiengwe, Marcello et al. 2012).

Na ausência de promotores definidos para a RNA polimerase II, a transcrição das unidades policistrônicas acontece de forma bidirecional desde os sítios do início da transcrição que estão localizados entre duas regiões de grupos de genes divergentes, e termina em regiões de genes convergentes as quais frequentemente contém genes tRNA, rRNA e snRNA (Martinez-Calvillo, Yan et al. 2003, Martinez-Calvillo, Nguyen et al. 2004). O processamento individual dos RNAs mensageiros (mRNA) acontece pela adição de *trans*-splicing de um *spliced leader RNA* de 39 nt no extremo 5' de cada mRNA acoplado a poliadenilação no extremo 3' (Matthews, Tschudi et al. 1994, Haile and Papadopoulou 2007).

Em relação a regulação da expressão de genes devido à falta de um controle transcricional, *Leishmania* usa vários mecanismos adaptativos para este fim. Se tem demonstrado que as regiões terminais 3' não traduzidas (3'UTRs) são importantes para monitorar a estabilidade e as taxas de tradução neste parasita (Boucher, Wu et al. 2002, McNicoll, Muller et al. 2005, Bringaud, Muller et al. 2007, Haile, Dupe et al. 2008, Muller, Padmanabhan et al. 2010). Outro dos mecanismos usado por *Leishmania* como estratégia para superar as condições de estresse da pressão de droga é a variação do número de cópias onde estão inclusas a aneuploidia e a amplificação/deleção de genes, a qual é possivelmente empregada para regular a expressão dos alvos de drogas, transportadores de drogas ou outros determinantes de resistência. Semelhante à *Leishmania*, este fenômeno tem sido observado em outros organismos e até em células cancerígenas, onde a variação de dosagem de genes e de cromossomos tem consequências importantes na susceptibilidade às drogas, adaptabilidade e proliferação (Gordon, Resio et al. 2012, Shor and Perlin 2015).

1.3. Variação do Número de Cópias do DNA

O gênero *Leishmania* é conhecido por ter uma plasticidade extensa no seu genoma, mostrando variações na dosagem de genes e no número de cromossomos. Inicialmente, a maioria das amplificações estudadas na *Leishmania* foram geradas em resposta a múltiplas etapas de seleção em droga de incremento gradual ou seleção passo a passo. Neste modelo de seleção para resistência, relativamente pequenos incrementos de pressão de droga são usados para aumentar a probabilidade de isolar eventos de amplificação. Seguindo este método, as amplificações são facilmente detectadas como abundantes fragmentos após a digestão do DNA genômico total com enzimas de restrição na eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, os quais podem ser diretamente isolados e clonados, possibilitando a identificação de genes relacionados a mecanismos de resistência (Coderre, Beverley et al. 1983, Haimeur and Ouellette 1998).

Outra das abordagens amplamente usadas para a detecção das amplificações é baseado na diferença das propriedades de mobilidade que existe entre as amplificações circulares extracromossomais quando comparadas a DNAs lineares numa eletroforese de campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE*), na qual as estruturas circulares super-enoveladas apresentam uma mobilidade independente do tempo do pulso na eletroforese (Beverley 1988, Hightower and Santi 1989). As amplificações circulares super-enoveladas tendem a migrar ao longo de uma faixa um pouco diferente do que os cromossomos lineares por causa da resposta variável de diferente topologia nos campos elétricos alternantes do sistema PFGE (Beverley 1988). Após a eletroforese no campo pulsado e a transferência do DNA para uma membrana de nylon, estas estruturas amplificadas são detectadas pela hibridização com uma sonda específica de DNA complementar na técnica de *Southern blotting*.

Um dos medicamentos mais empregados para o estudo dos mecanismos de resistência em *Leishmania* é o antifolato metotrexato (MTX), um inibidor específico da diidrofolato redutase (DHFR), uma enzima importante que provê folatos reduzidos para a célula. Estes folatos reduzidos são utilizados como co-fatores numa variedade de reações de transferência de carbonos incluindo a síntese de timidilato. Nas plantas e nos protozoários, a DHFR se encontra fusionada com a timidilato sintase (TS) resultando numa enzima DHFR-TS bifuncional (Beverley, Ellenberger et al. 1986, Grumont, Washtien et al. 1986, Ivanetich and Santi 1990). A DHFR reduz a diidrofolato

(DHF) a tetraidrofolato (THF), que é logo convertido em dTMP pela (TS). Esta inibição competitiva da DHFR pelo MTX leva a depleção de THF nas células e consequentemente inibição da síntese do DNA (Figura 4).

As células de *L. major* selecionadas para resistência a MTX apresentam duas amplificações gênicas funcionais diferentes, as quais podem ter um ou dois tipos diferentes de elementos extracromossomais. A primeira delas é uma amplificação denominada região R de 30kb, que procede do cromossomo 6 e contém o gene que codifica para a DHFR-TS (Coderre, Beverley et al. 1983, Beverley, Coderre et al. 1984, Beverley, Ellenberger et al. 1986, Beverley 1991). Esta amplificação aparece como uma amplificação circular extracromossomal multi-cópia que compreende moléculas de DNA circular individuais super-enoveladas. Estas moléculas podem ser monômeros ou dímeros contínuos de repetições diretas da unidade de amplificação original e normalmente são instáveis na ausência de pressão de droga. O outro elemento extracromossomal denominado região H de 68 a 85kb, dependendo as diferentes espécies de *Leishmania* foi encontrado presente nos parasitas selvagens e resistentes ao MTX e outros medicamentos não relacionados como a primaquina e a terbinafina (Beverley, Coderre et al. 1984, Ellenberger and Beverley 1989).

Um dos primeiros elementos extracromossomais caracterizados procedeu do cromossomo 23 em *L. major* e *L. tropica*, o qual continha uma sequência duplicada com orientação invertida de 30 a 38kb separados por uma sequência de DNA única de 4 e 5kb (Beverley, Coderre et al. 1984). A forma circular das amplificações da região H varia entre repetições invertidas extracromossomais monoméricas até dímeros de repetições invertidas básicas ou repetições diretas de 17kb. Esta região continha uma cadeia curta do gene da pteridina redutase 1 (*PTR1*) que confere resistência ao MTX (Papadopoulou, Roy et al. 1994) (Papadopoulou, Roy et al. 1992) por redução das pteridinas (Bello, Nare et al. 1994). A PTR1 é capaz de reduzir o diidrofolato em tetraidrofolato até um certo ponto e sua sobreexpressão compensa a inibição da DHFR-TS pelo MTX (Bello, Nare et al. 1994, Nare, Luba et al. 1997, Drummelsmith, Brochu et al. 2003). Outro gene encontrado na região H foi o gene *ABCC3* (conhecido também como gene da glicoproteína P, *pgpA* ou gene da Proteína resistente a Multidroga A, *MRPA*) pertencente a família de transportadores ABC o qual

Figura 4. Entrada e metabolismo da biopterina e folato em *Leishmania*. A biopterina entra na *Leishmania* através da permease BT1, o qual é um transportador de folato com baixa afinidade mas não de metotrexato (MTX). Os transportadores FT1 e FT5 e possivelmente outras permeases, medeiam a entrada de alta afinidade do folato e MTX. O folato pode ser reduzido a diidrofolato (H₂-Folato) e tetraidrofolato (H₄-Folato) por a diidrofolato redutase (DHFR), e a biopterina pode ser reduzida a H₂-biopterina e H₄-biopterina por a pteridina redutase 1 (PTR1). A PTR1 é também capaz de reduzir o folato com baixa afinidade que DHFR. Metileno H₄-folato, gerado de H₄-folato por a serina hidroximetiltransferase (SHMT), é requerido para a conversão por a timidilato sintase (TS) de dUMP para dTMP que é essencial para a síntese do DNA. MTX é um inibidor competitivo da DHFR e assim previne a síntese de dTMP. A resistência ao MTX pode ser medeada por alterações na expressão de FT1, BT1, DHFR e PTR1. Esta figura foi modificada a partir da figura previamente publicada (Cunningham and Beverley 2001).

está envolvido na resistência a arsenito de sódio e aos antimoniais (Ouellette, Fase-Fowler et al. 1990, Callahan and Beverley 1991, Papadopoulou, Roy et al. 1994, Ouellette, Legare et al. 1998). Apesar de que este gene foi inicialmente detectado nestas amplificações circulares da região H nas células resistentes ao MTX, foi demonstrado depois que a resistência ao MTX na *Leishmania* dependia da presença e super expressão da *PTR1* (Papadopoulou, Roy et al. 1992) e não do gene *ABCC3* contido nestes círculos.

A partir da caracterização inicial dos amplicons da região H e o mapeamento dos pontos de rearranjo destas estruturas na *L. tarentolae*, se encontrou que o locus da região H na cópia cromossomal continha duas repetições invertidas com alto grau de homologia, flanqueando duas regiões diferentes (Ouellette, Hettema et al. 1991, Grondin, Papadopoulou et al. 1993, Papadopoulou, Roy et al. 1993, Grondin, Roy et al. 1996). Uma das repetições invertidas mostrou uma extensão de 198pb com ligeiras diferenças nas sequências, e a outra repetição apresentou uma extensão de 1241pb, diferindo pela substituição de 10pb e uma deleção de 96pb da repetição de 198 pb (Ouellette, Hettema et al. 1991). O rearranjo destas sequências de forma direta ou invertida mediante recombinação homóloga permitiam a geração das amplificações circulares ou lineares reportadas (Ouellette, Hettema et al. 1991). Além disso, também se encontrou amplificações circulares por recombinação homóloga entre as sequências dos genes *ABCC3* de 750 pb na região H (Ouellette, Hettema et al. 1991). Esta variedade de amplificações demonstrou que diferentes pontos de rearranjo são usados durante a formação da amplificação. Por outro lado, estes achados permitiram postular também que alterações na replicação poderiam favorecer pelo menos um destes tipos de amplificação na *Leishmania* (Ouellette, Hettema et al. 1991, Papadopoulou, Roy et al. 1993).

Estudios prévios mostraram que *Leishmania* apresenta sequências repetitivas amplamente distribuídas no seu genoma, geralmente não codificadoras e altamente conservadas entre as diferentes espécies de *Leishmania* (Dias, Ruiz et al. 2007, Ubeda, Raymond et al. 2014). Estas sequencias seriam potencialmente rearranjadas de forma estocástica para gerar elementos extracromossomais (Ubeda, Raymond et al. 2014). Um destes estudos usando análises de bioinformática e funcionais identificou um total de 1926 repetições em orientações diretas ou invertidas na *L. major*, o que representa 5% do total do seu genoma, permitindo por estimação, a

formação potencial de 4601 amplificações. As repetições invertidas foram encontradas geralmente mais próximas aos telômeros, enquanto que as repetições diretas foram encontradas distribuídas ao longo dos cromossomos. Aproximadamente 68% destas sequências são de retrotransposons degenerados intercalados (SIDERs, *interspersed degenerate retroposons*) tipo 1 (SIDER1) ou tipo 2 (SIDER2), que são versões truncadas de retrotransposons ativos, as quais têm sido associadas com regulação pós-transcrição. No caso de SIDER1 estas sequências têm sido associadas à modulação da expressão gênica na etapa de tradução, e no caso de SIDER2, estas têm sido associadas com a estabilidade do mRNA (Boucher, Wu et al. 2002, McNicoll, Muller et al. 2005, Bringaud, Muller et al. 2007, Muller, Padmanabhan et al. 2010). É possível que estas sequências tenham duas funções no genoma, uma de tipo estrutural, servindo como plataforma para facilitar os rearranjos na amplificação gênica, e outra de tipo funcional, regulando a expressão do genes, o que explicaria sua conservação ao longo da evolução para facilitar a amplificação de locais essenciais respondendo às mudanças nas condições do meio ambiente (Ubeda, Raymond et al. 2014).

1.4. Modelos de Variação no Número de Cópias

Baseada na orientação das repetições usadas na recombinação homóloga, a amplificação gênica pode classificar-se em amplificação circular extracromossomal, e amplificação em tandem mediada por repetições diretas (RD), e amplificação linear, mediada por repetições invertidas (RI) (Figura 5).

A recombinação homóloga entre repetições diretas pode gerar tanto estruturas circulares, por entrecruzamento das regiões repetitivas numa mesma cromátide, como a duplicação em tandem no locus, gerada pelo entrecruzamento desigual das cromátides irmãs. Assim, a amplificação pode ser não conservativa ou conservativa, dependendo se tem perda ou não da região amplificada, respectivamente (Ubeda, Raymond et al. 2014).

Por outro lado, a recombinação homóloga entre repetições invertidas (RI) conforme os modelos propostos, poderia promover o pareamento entre as repetições durante a replicação, o que levaria a parada da forquilha de replicação e sua consequente dissociação. Este pareamento das repetições invertidas poderia ser

usada para a síntese do DNA, permitindo a duplicação do locus até o final do telômero (Ubeda, Raymond et al. 2014). (Figura 5).

Duas proteínas do reparo do dano no DNA na *Leishmania* têm sido envolvidas no fenômeno de amplificação gênica, a Rad51 recombinase e a MRE11 nuclease. Estas duas proteínas atuam em diferentes aspectos no reparo por recombinação homóloga, um mecanismo que é evolutivamente conservado nos tripanossomatídeos.

A Rad51 recombinase participa na procura e pareamento homólogo da cadeia do DNA na cromátide irmã para o reparo. Esta proteína é induzida na *Leishmania* pelo DSB no DNA e sua inativação leva a incapacidade dos parasitas a formar elementos circulares extracromossomais, mas que continuam tendo a capacidade de produzir amplificações lineares na pressão de droga (Ubeda, Raymond et al. 2014). A nuclease MRE11 é outra proteína do reparo do DNA que interage com a Rad50 e NBS1 para formar o complexo MRN, o qual é importante para a detecção e reparo da DSB por recombinação homóloga. A inativação da MRE11 prejudica a habilidade do parasita para formar amplificações lineares no nível das sequências repetitivas invertidas na seleção em droga, no entanto não altera a capacidade de formar amplificações circulares (Laffitte, Genois et al. 2014). Além disso, a inativação da MRE11 sozinha ou com seu parceiro RAD50 leva a uma extensiva translocação cromossômica na *Leishmania* (Laffitte, Leprohon et al. 2016) mostrando que o complexo MRE11/RAD50 é importante para a manutenção da integridade do genoma além de sua função nos rearranjos.

1.5. Variação do Número de Cópias dos Cromossomos e Mosaicismo de Ploidia

A variação do número de cópias dos cromossomos representa outra camada de complexidade na alteração da dosagem de genes na *Leishmania*.

A aneuploidia, definida como o número de cromossomos diferente do múltiplo exato do número haplóide, é geralmente considerado deletério em muitos organismos estudados (Tang and Amon 2013), o qual pode levar a anormalidades no desenvolvimento ou a morte. Um exemplo das anormalidades encontradas nos seres humanos causada pela aneuploidia é a trisomia 21 e a trisomia dos cromossomos sexuais (Hassold and Hunt 2001). Além disso, a aneuploidia é uma característica

Figura 5. Mecanismos potenciais para amplificação gênica em *Leishmania*. **A)** A RAD51 recombinaase medeia a recombinação homóloga entre sequências repetitivas diretas (SRD) e leva a (i) amplificação circular extracromossômica ou (ii) duplicação em tandem intracromossômica por troca de cromátides irmãs desiguais ou replicação induzida por ruptura medeada por RAD51. As setas pretas representam SRD. **B)** A nuclease MRE11 processa as extremidades do DNA após a quebra de uma única linha (SSB), ou quebra de dupla fita (DSB) ou a formação de *hairpin* durante a replicação e leva a amplificação linear extracromossômica. As setas pretas representam sequências repetitivas invertidas (SRI). Os segmentos verdes representam as regiões do DNA amplificadas. *dsDNA*, DNA de dupla fita; *ssDNA*, DNA de simples fita. Esta figura foi modificada da figura previamente publicada (Laffitte, Leprohon et al. 2016).

comum no câncer, que tem sido relacionada com a tumorigênese (Lv, Zhang et al. 2012). Por outro lado, apesar dos efeitos negativos da aneuploidia, se tem evidenciada contribuição da poliploidia na evolução e a diversificação de muitas espécies. Em linha com isto, se tem relatado também casos onde a aneuploidia é bem tolerada e potencialmente benéfica em algumas plantas (Chester, Gallagher et al. 2012), fungos (*Saccharomyces* e *Candida*) (Selmecki, Forche et al. 2010, Hose, Yong et al. 2015) e no gênero *Leishmania*.

Inicialmente o gênero *Leishmania* foi considerado um organismo diplóide. No entanto várias evidências mostraram que *Leishmania* é naturalmente aneuplóide. Um exemplo disto foi encontrado nas tentativas para gerar mutantes nulos nas diferentes espécies de *Leishmania*, onde foram encontrados cópias adicionais de cromossomos (Cruz, Titus et al. 1993, Dubessay, Ravel et al. 2001, Martinez-Calvillo, Stuart et al. 2005). Outro exemplo de aneuploidia é a monossomia do cromossomo 32 na *L. infantum* que foi demonstrado por uma única etapa de inativação alélica do gene que codifica para uma proteína da família ABC (Leprohon et al., 2009).

Análises recentes do genoma de *Leishmania* têm mostrado que a aneuploidia é muito mais generalizado neste gênero do que se acreditou. O sequenciamento de nova geração do genoma de várias espécies e linhagens de *Leishmania* mostraram uma extensa variação do número de cópias dos genes e dos cromossomos, evidenciando assim um alto grau de aneuploidia (Rogers, Hilley et al. 2011). A análise do número de cópias dos cromossomos a partir dos dados de sequenciamento de duas linhagens de *L. major*, *L. mexicana*, *L. donovani* e uma linhagem de *L. braziliensis* e *L. infantum* mostraram a presença de cromossomos supernumerários e só 20 cromossomos dissômicos em todas as amostras. Neste mesmo estudo, *L. braziliensis* foi predominantemente triploide com alguma tetrassomia e um cromossomo hexassômico enquanto que as outras linhagens e espécies tinham mais variabilidade na ploidia (Rogers, Hilley et al. 2011) (Apêndice A). O cromossomo 31, que foi o primeiro cromossomo reportado em mostrar aneuploidia (Akopyants, Kimblin et al. 2009) foi o único cromossomo que incrementou o número de cópias em cada espécie de *Leishmania* o qual também foi observado em outros relatos (Downing, Imamura et al. 2011).

Em relação às análises de ploidia em amostras clínicas, o sequenciamento genômico de 17 de linhagens de *L. donovani* isolados de pacientes da Índia e Nepal

mostraram também um amplo padrão de aneuploidia em cada linhagem celular. Dos 36 cromossomos, 9 apresentaram dissomia, um apresentou tetrassomia (cromossomo 31) e os 26 cromossomos restantes apresentaram ploidia variável (Downing, Imamura et al. 2011) (Apêndice A) Além disso, cada isolado clínico tinha um único cariótipo. Em outra análise do sequenciamento de 204 linhagens de *L. donovani* isoladas de pacientes das regiões de Nepal, Índia e Bangladesh mostraram também diversidade no cariótipo. A maioria dos isolados apresentaram aneuploidia, e fora a tetrassomia do cromossoma 31, os demais cromossomos mostraram alguma variação na ploidia (Imamura, Downing et al. 2016).

A diferença das análises globais como o sequenciamento do genoma que mostram uma visão cumulativa da ploidia de cada cromossoma, o qual é a média da população dos parasitas (potencialmente heterógena) na amostra, os métodos baseados nas análises de células individuais como a hibridização fluorescente in situ (*FISH*), permitem conhecer a ploidia ao nível de uma única célula (Sterkers, Lachaud et al. 2011, Dujardin, Mannaert et al. 2014, Sterkers, Crobu et al. 2014). Usando esta abordagem, se demonstrou que *Leishmania* apresenta mosaicismos de aneuploidia, o que significa que os cromossomos em cada célula podem estar em dois ou mais estados de ploidia (monossômico, dissômico ou trissômico) resultando num conteúdo variável em cada célula (Sterkers, Lachaud et al. 2011). Apesar de que a ploidia total do genoma analisada por sequenciamento e a ploidia acumulativa inferida por *FISH* foram próximas a dois, a análise da ploidia no nível individual mostra uma maior resolução destes eventos (Sterkers, Lachaud et al. 2011, Sterkers, Crobu et al. 2014) (Figura 6).

Em relação à hereditariedade da aneuploidia, se encontrou que clones derivados de uma linhagem parental podiam ter uma ploidia semelhante ao parental ou ser completamente diferente (Sterkers, Lachaud et al. 2011). Nas análises de segregação dos cromossomos foram encontradas distribuições tanto simétricas como distribuições assimétricas destes. Curiosamente, nas distribuições assimétricas o número total de cromossomos homólogos nos núcleos em divisão sempre foi número ímpar, que é 1+2 ou 2+3 (Sterkers, Lachaud et al. 2011) (Figura 6).

O defeito na segregação foi descartado como mecanismo responsável da aneuploidia em *Leishmania*, devido a que o defeito na segregação levaria a uma distribuição dos cromossomos em números pares e não em números ímpares como

Figura 6. Mosaicismo de ploidia. **A)** Diversidade dos padrões de ploidia na linhagem de *L. major* Friedlin. O número de cromossomos pode variar de uma célula a outra, apresentando-se como monossômico, dissômico ou trissômico para um cromossomo em particular. O cromossomo 2 que é mostrado na figura, é predominantemente monossômico. **B)** padrões de ploidia da linhagem de *L. major* Friedlin. A porcentagem de monossomia (amarelo), dissomia (azul), e trissomia (vermelho) para os cromossomos (Cr.) 1, 2, 5, 12, 17, 27 e 36 são mostrados. Eixo y: porcentagem de ploidia, Eixo x: os 7 cromossomos analisados. Os cromossomos 1, 5 e 17 são predominantemente trissômicos, o cromossomo 2 é predominantemente monossômico e os cromossomos 12, 27 e 36 são predominantemente disômicos. **C)** Ploidia cumulativa dos dados de FISH. Eixo y Ploidia cumulativa de FISH (0-3), eixo x os 7 cromossomos analisados. A ploidia cumulativa inferida de FISH para os cromossomos 12, 27 e 36 é próximo de 2,0; a pesar do fato de que eles estão presentes no mínimo em dois estados de ploidia. **D)** Heredabilidade dos padrões de ploidia através das gerações. As porcentagens de células monossômicas (amarelo), dissômico (azul), e trissômico (vermelho) para os cromossomos 1, 2, 5, 12, 17, 27, e 36 são apresentados em 6 clones ou subclones derivados da linha parental de *L. major* Friedlin. O mosaicismo não é perdido nos clones, e o padrão de ploidia é semelhante entre o parental e os clones, assim como entre os clones. Esta figura foi modificada a partir da figura publicada (Sterkers, Lachaud et al. 2012). foi observado em *Trypanosoma brucei*

(Bessat and Ersfeld 2009), sugerindo que o defeito na regulação da replicação dos cromossomos seria o mecanismo responsável da aneuploidia em *Leishmania* (Sterkers, Lachaud et al. 2011).

Por outro lado, se tem reportado uma correlação direta entre o número dos cromossomos e os níveis de transcritos na maioria dos casos (Mukherjee, Boisvert et al. 2013). Além disso, no contexto da resistência a droga, a reversão ao estado normal de ploidia é observado após a remoção da pressão da droga (Ubeda, Legare et al. 2008, Leprohon, Legare et al. 2009), sugerindo que a aneuploidia poderia atuar como mecanismo de adaptação do parasita ao meio ambiente.

1.6. Estabilidade Genômica nas Celulas Eucariotas

As células são continuamente desafiadas por agentes intrínsecos e extrínsecos que ameaçam a integridade de seus genomas durante o tempo de vida. Para poder sobreviver a essas condições e poder transmitir a informação genética intacta para as gerações seguintes, as células tem desenvolvido uma rede altamente organizada e coordenada para fazer frente ao estresse genotóxico conhecido como resposta ao dano do DNA (DDR) (Zhou and Elledge 2000, Harper and Elledge 2007, Ciccía and Elledge 2010). Esta resposta celular tem a capacidade de detectar e sinalizar os danos no DNA, parar a progressão do ciclo celular mediante a ativação dos pontos de checagem (ou *checkpoints*), recrutar e ativar um mecanismo apropriado do reparo ou eliminar as células com genomas não reparáveis.

Nas células eucarióticas a resposta celular ao dano é regulado e coordenado pela via de sinalização DDR, a qual usa sensores tradutores e efetores (Zhou and Elledge 2000, Harper and Elledge 2007, Ciccía and Elledge 2010). Os sensores são proteínas que reconhecem diretamente estas estruturas do DNA danificado e ativa a maioria das quinases da DDR. Os mediadores são proteínas que facilitam os eventos de fosforilação dentro da rede da DDR, e os efetores são os substratos das quinases da DDR que participam em um amplo espectro de processos celulares para garantir a estabilidade genômica.

Nas células eucarióticas as quinases principais na DDR são ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*), ATR (*ATM- and Rad3-Related*), e DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase*) (Blackford and Jackson 2017). Estas quinases

serina/treonina são membros da família quinase fosfatidilinositol-3-quinase (PIK Ks) que em resposta ao dano no DNA fosforilam várias proteínas nos motivos Ser/Thr-Glu (Lempiainen and Halazonetis 2009, Lovejoy and Cortez 2009). ATM responde primariamente a quebra de dupla fita (DSBs) (Shiloh 2003) enquanto que ATR responde a um amplo espectro de dano no DNA, incluindo DSBs e uma variedade de lesões no DNA que interferem com a replicação (Saldivar, Cortez et al. 2017). ATM tem uma função importante na ativação do *checkpoint* G1/S prevenindo a entrada de células com dano no DNA na fase S e também contribui na ativação do *checkpoint* intra S. Por outro lado, ATR reforça o *checkpoint* intra S durante a progressão na fase S e na resposta ao dano no DNA. Além disso, ATR também é um importante mediador do *checkpoint* em G2/M do ciclo celular para prevenir a entrada prematura das células na mitose (Saldivar, Cortez et al. 2017).

1.7. Via de Ativação da Quinase ATR

A quinase ATR responde a vários tipos de estresse genotóxico que tem em comum o bloqueio ou diminuição da síntese das DNA polimerases e a formação de estruturas compostas, pelo menos em parte, de DNA de simples fita (*ssDNA*). (Saldivar, Cortez et al. 2017). Estes incluem inibidores da DNA polimerase, depleção dos deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), inibidores das topoisomerases, radiação UV, agentes alquilantes e ligações entre as fitas do DNA.

A quinase ATR é recrutada mediante sua proteína parceira de interação de ATR (ATRIP) nas extensões de DNA de fita simples cobertas pela proteína de replicação A (RPA) (Cortez, Guntuku et al. 2001, Zou and Elledge 2003). Após o recrutamento, a ativação da ATR precisa de mudanças conformacionais mediadas pela ligação de proteínas ativadoras e de junções de DNA de simples fita e dupla fita (*ssDNA/dsDNA*). Dois ativadores tem sido identificados, a proteína de ligação topoisomerase II (TOPBP1) que se liga tanto na ATR como na ATRIP mediante seu domínio de ativação de ATR (AAD) (Kumagai, Lee et al. 2006) e o antígeno 1 associado ao tumor Ewing, que é recrutado através das interações diretas com RPA (Haahr, Hoffmann et al. 2016). A TOPBP1 é o ativador mais importante, demonstrado pelo fato de que a perda da TOPBP1 ou mutações no seu domínio de ativação da ATR (AAD) são letais nas células de mamíferos (Zhou, Liu et al. 2013). Uma interação importante da TOPBP1

para a ativação da ATR quinase é sua ligação com a cauda C terminal da subunidade Rad9 do complexo Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1) (Delacroix, Wagner et al. 2007, Lee, Kumagai et al. 2007). Este complexo é um heterotrímero em forma de grampo que comparte semelhança estrutural com o antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA), o qual é carregado nas junções de DNA de fita dupla e fita simples com extremidade 5' pelo complexo Rad17-RFC (Bermudez, Lindsey-Boltz et al. 2003, Zou, Liu et al. 2003). A interação da TOPBP1-Rad9 é importante para a ativação da ATR, no entanto, esta não é essencial para o recrutamento da TOPBP1 nas forquilhas estressadas (Yan and Michael 2009, Lee and Dunphy 2010). Em linha com isto, outros fatores como o complexo MRE11–RAD50–NBS1 (MRN) (Duursma, Driscoll et al. 2013, Lee and Dunphy 2013) e a proteína RHINO (Cotta-Ramusino, McDonald et al. 2011, Lindsey-Boltz, Kemp et al. 2015) têm sido envolvidos no recrutamento da TOPBP1. Após a ligação da TOPBP1 no complexo 9-1-1, este interage com ATR–ATRIP para a ativação de ATR. Uma vez ativa, a ATR fosforila a proteína quinase CHK, que é o principal efetor desta via, mediante a proteína claspina, a qual ajuda trazer a CHK1 à forquilha de replicação, próxima com ATR. (Kumagai and Dunphy 2000). A ativação destas quinases leva a parada do ciclo celular, supressão do disparo não programado das origens, estabilização da forquilha de replicação e estimulação do reparo e o reinício da forquilha. (Figura 7).

1.8. Funções da ATR na Sinalização de *Checkpoint*

1.8.1 Parada do Ciclo Celular

A ativação da Chk1 promove a degradação pelo proteassoma da CDC25A, CDC25B e CDC25C, fosfatases que removem as modificações inibitórias das quinases dependente de ciclina (CDKs) (Karlsson-Rosenthal and Millar 2006). A inativação destas fosfatases leva a uma progressão lenta ou a parada do ciclo celular por diminuição da atividade da CDK, permitindo mais tempo para o reparo do DNA e a entrada prematura na mitose, ou ativação da via de apoptose se o dano é extenso (Boutros, Dozier et al. 2006).

Figura 7. Via de activação de ATR-Chk1. (1) Os trechos de fita simples de DNA são recobertos por RPA. (2) O complexo Rad17-RFC2-5 e ATR são recrutados para o sítio da lesão. O complexo 9-1-1 é recrutado e, através de interação com TopBP1, reforça a permanência de ATR no sítio de lesão. (3) ATR fosforila Rad17 e Claspin, onde a fosforilação de esta última serve para o recrutamento de Chk1. (4) A fosforilação de Rad17 estimula a permanência do complexo 9-1-1, reforçando a permanência de ATR no local da lesão que por sua vez fosforila Chk1. Desta forma, a fosforilação de Chk1 é mantida, garantindo que a progressão do ciclo celular seja pausado, até que a região de DNA danificado seja reparada. Esta figura tomada de Medhurst, Warmerdam et al, 2008 (Medhurst, Warmerdam et al. 2008).

1.8.2. Regulação das origens de replicação

ATR e Chk1 previnem o disparo excessivo das origens. A perda da atividade da ATR leva a um excessivo disparo das origens em *early* S (Marheineke and Hyrien 2004, Shechter, Costanzo et al. 2004) e a perda da atividade de Chk1 leva ao disparo das origens de *late* S em *early* S, este último por ativação prematura do complexo ciclina A/CDK1 que promove presumivelmente o disparo das origens em *late* S (Katsuno, Suzuki et al. 2009). ATR também tem um papel na limitação da replicação do DNA, bloqueando o início desta em resposta ao estresse de replicação. ATR e Chk1 previnem o recrutamento da CDC45 para o complexo de manutenção do minicromossomo 2-7 (MCM2–7) e ativação desta helicase.

1.8.3. Inibição do Colapso da Forquilha Dependente de Nucleases

ATR regula a actividade da enzima da inversão da forquilha SMARCAL1 previniendo o colapso da forquilha (Couch, Bansbach et al. 2013). A perda da regulação por ATR leva a uma inversão excessiva das forquilhas e consequentemente à clivagem do DNA.

1.8.4. Controle da função do replissoma

ATR fosforila vários componentes do replissoma seguido do estresse de replicação, incluindo DNA polimerases, o carregador do grampo RFC1-5, MCM2-7, e RPA (Errico and Costanzo 2012) o que poderia alterar a progressão do replissoma (De Piccoli, Katou et al. 2012). FANCD2 pode ser recrutado por ATR nas forquilhas de replicação mediante a ligação ao MCM2-7 levando à progressão divergir da DNA polimerase e helicase, diminuindo a formação de *ssDNA* e ressecção do DNA nas forquilhas estressadas por MRE11 (Lossaint, Larroque et al. 2013). Chk1 também pode diminuir a taxa de elongação seguido do dano induzido por a camptotecina (CPT) (Conti, Seiler et al. 2007, Seiler, Conti et al. 2007).

1.8.5. Outras funções da ATR associadas à sinalização de *checkpoint*

Dentro de estas funções estão: a prevenção do esgotamento dos fatores de replicação em condições de estresse que inclui a combinação da inibição da ATR e a inibição da replicação com hidroxiuréia (HU) ou afidicolina (Toledo, Altmeyer et al. 2013); regulação da restauração da forquilha de replicação mediante a fosforilação de polimerases translesão (Gohler, Sabbioneda et al. 2011, Sale 2013) e proteínas da via

da restauração da forquilha dependente de Rad51 (Vassin, Anantha et al. 2009, Somyajit, Basavaraju et al. 2013, Murphy, Fitzgerald et al. 2014, Buisson, Niraj et al. 2017); e regulação da biossíntese de dNTPs mediante a expressão eficiente da subunidade M2 da ribonucleotídeo redutase a qual requer da atividade da ATR (Buisson, Boisvert et al. 2015).

1.9. O complexo Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1)

A determinação da estrutura do complexo de *checkpoint* 9-1-1 humano por análises cristalográficas mostrou que o complexo tem uma arquitetura em forma de anel com espaço suficiente para passar o DNA de dupla fita, que é gerado através da associação de suas subunidades, semelhante ao grampo PCNA (Dore, Kilkenny et al. 2009, Sohn and Cho 2009, Xu, Bai et al. 2009). Assim, o domínio C-terminal de uma proteína interage com o domínio N-terminal da seguinte proteína na ordem, Rad9, Hus1 e Rad1. A análise mostrou também que cada molécula do complexo 9-1-1 consiste de 18 folhas β (β I1- β I9 e β II1- β II9), 4 hélices α (α I1, α I2, α II1, α II2) (exceto Hus1 que apresenta 5 hélices α) e dois domínios (N-terminal e C-terminal) conectados por um laço de interconexão de domínios (*inter connecting domain loop, IDC loops*) (Figura 8).

Apesar da semelhança estrutural entre as três subunidades que compõem o complexo 9-1-1, existem diferenças importantes. Uma das diferenças mais notáveis e que constitui uma das características mais significativas destas subunidades é observada nos *IDC loops*, os quais são altamente variáveis entre as subunidades (Dore, Kilkenny et al. 2009, Sohn and Cho 2009, Xu, Bai et al. 2009). Estes laços servem para estabelecer interações com as proteínas ligantes, e diferente do complexo homotrimérico PCNA onde cada subunidade apresenta a mesma afinidade para os diversos ligantes, as diferenças entre estas regiões nas subunidades do complexo 9-1-1 sugere que cada proteína pode ter diferentes especificidades de ligação com as proteínas parceiras. Outras diferenças encontradas nas estruturas das subunidades individuais são a localização exclusiva da hélice α 3 no N-terminal do *IDC loop* em Hus1 e os *IDC loops* projetados até o núcleo do grampo em Rad9 (laço α II1- β II2) e Rad1 (laço α I2- β I7) mas não em Hus1 nem PCNA, sugerindo que estes laços tem funções únicas (Xu, Bai et al. 2009) (Figura 8).

Figura 8. Estrutura do complexo 9-1-1. **A)** Diagrama esquemático dos elementos estruturais secundários de uma molécula do complexo 9-1-1. O domínio N-terminal é mostrado em azul, enquanto o domínio C-terminal é mostrado em verde. O laço de interconexão de domínios ou *IDC loop* (*interconnecting domain loop*) é mostrado em vermelho. A hélice 3 inserida no terminal N do *IDC loop* em Hus1 é mostrado em laranja. α , Hélices α ; β , Folhas β . **B)** Diagrama tridimensional do complexo 9-1-1. DNT e DCT indicam os domínios N e C-terminal, respectivamente. **C)** Superposição do complexo 9-1-1 e o PCNA. Rad9 é mostrado em violeta, Hus1 em verde, Rad1 em amarelo e PCNA está em rosa claro. As diferenças mais notáveis são indicadas por círculos vermelhos. I mostra a hélice 3 inserida no N terminal do *IDC loop* de Hus1; II mostra o *loop* liga II4 e II6 em Hus1; e III e IV, respectivamente, mostram o *loop* II1-II2 de Rad9 e o *loop* I2-I7 de Rad1 perto do canal no complexo 9-1-1. Esta figura foi modificada a partir da figura previamente publicada (Xu, Bai et al. 2009).

Outra diferença entre PCNA e o complexo 9-1-1 é a cauda C-terminal não globular de 120 resíduos de aminoácidos presentes na Rad9, a qual contém sítios de fosforilação que são essenciais para a função do *checkpoint* como o recrutamento da TopBP1 e ativação da ATR quinase (Kumagai, Lee et al. 2006, Delacroix, Wagner et al. 2007), mas também com sítios de fosforilação desconhecida como o sítio de fosforilação pela quinase dependente de ciclina Cdc2 nos humanos (St Onge, Besley et al. 2003).

Em relação às interfaces intramoleculares dos complexos 9-1-1 e PCNA, também foram observadas algumas diferenças (Dore, Kilkenny et al. 2009, Sohn and Cho 2009, Xu, Bai et al. 2009). No complexo 9-1-1, cada interface é formada pela interação de folhas β antiparalelas entre as bordas das subunidades na parte externa do grampo reforçada por interações entre as hélices adjacentes na parte interna do anel e, diferente do PCNA onde as interfaces são formadas por subunidades idênticas, as interfaces do complexo heterotrimérico variam em extensão, polaridade e graus de inclinação. Estas diferenças nas interfaces têm sido usadas para ajudar a explicar o possível mecanismo de abertura do 9-1-1 após sua ligação ao DNA. Normalmente os anéis pré-formados são abertos para serem carregados no DNA pela maquinaria de carregamento dos grampos (Yao, Johnson et al. 2006). Assim, diferente do PCNA, onde todas as interfaces são equivalentes e a abertura do anel pré-formado pode acontecer em qualquer interface, a abertura do complexo 9-1-1 provavelmente aconteça na interface menos estável a qual é a formada entre Rad9-Rad1 (Dore, Kilkenny et al. 2009, Sohn and Cho 2009).

O complexo carregador do 9-1-1 é o mesmo complexo fator de replicação C (RFC) responsável para o carregamento do PCNA, exceto que a subunidade Rfc1 é substituída pela Rad17 para formar o complexo Rad17-RFC e, diferente do PCNA que se liga a RFC1-5 com especificidade pela ressecção 3' do DNA (Ellison and Stillman 2003), o complexo 9-1-1 é recrutado na ressecção 5' pelo complexo Rad17-RFC. Por outro lado, baseados nas análises cristalográficas do complexo RFC-PCNA das leveduras em presença de ATP (Bowman, O'Donnell et al. 2004) e assumindo que o mecanismo de carregamento por Rad17 RFC é o mesmo que para PCNA pelo RFC, Hus1 se ligaria a Rfc3 e Rad9 se ligaria a Rfc5, devido a que estas duas subunidades têm regiões hidrofóbicas semelhantes ao PCNA que poderiam acomodar os motivos de interação hidrofóbicos destas fatores (Dore, Kilkenny et al. 2009), enquanto Rad1

Figura 9. Modelo do complexo Rad-RFC-9-1-1. **A)** Modelo construído mediante o acoplamento da estrutura do complexo RFC-PCNA 1SXJ (Bowman et al., 2004) em 9-1-1 e substituindo a subunidade Rfc1 por um modelo de homologia do Rad17, gerado pelo servidor Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>). Neste modelo, Rad9 (verde) e Hus1 (violeta), os quais tem um bolso hidrofóbico semelhante ao de PCNA, interagem com as subunidades Rfc2-5, enquanto Rad1, que apresenta uma superfície de interação distinta, interage com a subunidade Rad17. As subunidades do complexo Rad17-RFC estão indicadas com as cores como segue: Rfc2 (laranja), Rfc3 (amarelo), Rfc4 (verde), Rfc5 (vermelho) e Rad17 (azul) **B)** Diagrama esquemático das interações modeladas entre RFC e o complexo 9-1-1. A interface Rad9-Rad1 (seta), a qual é a menor comparada com as outras interfaces e provavelmente a menos estável, está localizada na posição em que as mudanças conformacionais acopladas a ATPase no complexo Rad-RFC, deslocam o anel para permitir a passagem do DNA no interior do grampo. Esta figura foi modificada a partir da figura previamente publicada (Dore, Kilkenny et al. 2009).

se ligaria a Rad17 (Xu, Bai et al. 2009) e Rfc4 na interface entre Hus1 e Rad1. Além disso, baseados nas análises de microscopia eletrônica do complexo RFC-PCNA em *archaea* e análises bioquímicos em levedura, o Rfc2 provavelmente se ligaria na interface de Rad9 e Hus1 (Miyata, Suzuki et al. 2005) (Figura 9).

Outra característica distintiva do complexo 9-1-1 comparado com o PCNA é o seu potencial eletrostático (Dore, Kilkenny et al. 2009, Sohn and Cho 2009). O complexo 9-1-1 mostra um potencial eletrostático fortemente positivo na superfície interna do anel semelhante ao PCNA, no entanto a distribuição das cargas do complexo 9-1-1 são notavelmente diferentes do PCNA. Neste último, os laços contêm regiões carregadas negativamente, as quais estão simetricamente distribuídas em torno do anel. Contrariamente a isto, o complexo 9-1-1 mostra uma distribuição assimétrica da carga em torno da superfície externa. Rad1 mostra um potencial negativo próximo ao *IDC loop*, enquanto que Hus1 mostra um potencial fortemente positivo nesta mesma região (Figura 10).

Quanto à relação evolutiva, as análises filogenéticas têm mostrado que os grampos do DNA heterotriméricos evoluíram duas vezes e independentemente nos eucariotos e em *archaea*, sendo que o complexo 9-1-1 desenvolveu-se uma vez no começo da evolução eucariota (Dore, Kilkenny et al. 2009). Isto é apoiado pelo fato de que homólogos de PCNA foram encontrados em *archaea* formando homotrímeros como em eucariotos. No entanto em *crenarchaea*, estes complexos foram heterotriméricos (Dionne, Nookala et al. 2003) com subunidades mais relacionadas aos PCNAs homotrimérico de eucariotos e *euriarchaea* que com o 9-1-1 eucariótico. Além disso, as subunidades do complexo 9-1-1 são mais relacionadas entre elas que com os PCNAs encontrados nos mesmos organismos, sugerindo que estes grampos evoluíram de um antepassado comum e que durante a evolução o complexo 9-1-1 foi restringido ao controle da sinalização de *checkpoint* e reparo do DNA, enquanto o PCNA foi adaptado para a função na replicação.

Além do papel na ativação do checkpoint, o complexo 9-1-1 e suas subunidades individuais parecem estar envolvidas em outros processos. Se tem relatado que Rad9 interage com os membros da família Bcl2 para promover a apoptose (Komatsu, Miyashita et al. 2000)..

Figura 10. Superfície eletrostática do complexo Rad9-Hus1-Rad1 e PCNA. **A)** O potencial eletrostático da superfície do complexo 9-1-1 está representado com as cores, azul para o potencial positivo e vermelho para o potencial negativo. O laço de interconexão de domínios ou *IDC loop* (*interconnecting domain loop*) carregado positivamente e a folha $\beta 1$ e $\beta 7$ em Hus1 são mostrados. **B)** Representação de potencial de superfície de PCNA humano. Esta figura foi modificada a partir da figura previamente publicada (Sohn and Cho 2009).

O complexo também interage e estimula várias proteínas envolvidas no reparo por excisão de base incluindo a endonuclease flap 1 (FEN1), várias glicosilases, DNA polimerase β e a DNA ligase 1 (Touelle, El-Andaloussi et al. 2004, Chang and Lu 2005, Smirnova, Touelle et al. 2005, Guan, Madabushi et al. 2007). O complexo também é requerido para os eventos de recombinação homóloga (Ngo, Balakrishnan et al. 2014, Ngo and Lydall 2015) e poderia ter alguma função na replicação do DNA devido a interação física entre Mec3 (Hus1) e um componente do complexo de pré-replicação Mcm10 (Alver, Zhang et al. 2014). Essas descobertas sugerem que o complexo 9-1-1 pode ter duas funções, uma como plataforma para o recrutamento que reconhece e estimula o reparo, e outra como sensor do dano no DNA ativando a via de resposta ao dano.

1.10. Detecção e sinalização de DSBs por ATM

Em resposta a DSB, a quinase ATM localiza-se nos sítios de dano onde fosforila um número de substratos como Brca1, Chk 2, e p53 os quais mediam o reparo do DNA, parada do ciclo celular, apoptose, entre outros processos (Shiloh 2003, Lavin 2008). Um dos primeiros fatores recrutados na DSB é o complexo Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN), o qual é um regulador importante da ativação da ATM. Este complexo MRN atua como um sensor de DSBs que reconhece as extremidades da dsDNA ou as junções dsDNA/ssDNA localizando-se nas regiões flanqueadas de dsDNA para ativar a ATM (Uziel, Lerenthal et al. 2003). Outro fator importante que interage através da extremidade carboxi-terminal com ATM é a proteína Nbs1 (Falck, Coates et al. 2005). No entanto esta interação só é importante para a fosforilação de alguns substratos e não de todos os substratos de ATM (Stracker, Morales et al. 2007).

Após a ativação inicial da ATM pelas extremidades do DNA, ATM aciona uma cascata de eventos na cromatina flanqueada por DSBs. O evento crítico que conduz este processo é a fosforilação da variante da histona H2AX por ATM. Esta fosforilação é disseminada sob grandes domínios de cromatina flanqueando a quebra do DNA (Meier, Fiegler et al. 2007, Savic, Yin et al. 2009). A fosforilação desta histona não é crítica para os substratos tais como Chk2 e p53 (Fernandez-Capetillo, Chen et al. 2002), no entanto, esta é requerida para a acumulação de várias proteínas do reparo do DNA e complexos remodeladores de cromatina arredor da DSBs.

1.11. Mudança da Detecção e Sinalização de ATM para ATR na Quebra do DNA

As DSBs não somente ativam a quinase ATM, mas também ativa a quinase ATR, as quais são críticas para a resposta de checkpoint induzida por DSB e o reparo desta lesão. Como mencionamos anteriormente, as quinases ATM e ATR tem distintas especificidades para detectar o dano no DNA. Diferente de ATM, ATR é ativada por um amplo espectro de lesões no DNA junto com DSBs, onde a localização de ATR-ATRIP nos sítios de dano depende da interação direta de ATRIP com as regiões de ssDNA cobertas por RPA, indicando que ssDNA poderia ser a estrutura que favorece a resposta de ATR nas DSBs (Zou and Elledge 2003).

Nas DSBs geradas durante a fase S, as estruturas de ssDNA podem ser formadas mediante o processamento das extremidades do DNA no reparo por HR, no qual se precisa, não somente de sequências homólogas como moldes, mas também de extremidades de ssDNA para a procura dessas sequências homóloga para o reparo. Neste processo, a ressecção da DSBs gera ssDNA pela atividade de várias nucleases (Symington and Gautier 2011) entre as que se incluem o complexo MRN e suas proteínas associada CtIP (Limbo, Chahwan et al. 2007, Sartori, Lukas et al. 2007), Exo1 (Tomimatsu, Mukherjee et al. 2012) e Dna2 (Wawrousek, Fortini et al. 2010). Além disso, a quinase ATM é requerida para a ressecção eficiente através da regulação de CtIP e Exo1 (Yoo, Kumagai et al. 2009, Bolderson, Tomimatsu et al. 2010). Condizente com esta ideia de que a ressecção da DSB é importante para a ativação da ATR, se tem observado que a depleção ou inativação da ATM, Mre11, CtIP, Exo1, e Dna2 levam a uma diminuição da resposta de ATR para o DSBs (Adams, Medhurst et al. 2006, Jazayeri, Falck et al. 2006, Myers and Cortez 2006, Sartori, Lukas et al. 2007, Tomimatsu, Mukherjee et al. 2012).

1.12. Possível função do complexo 911 na plasticidade genômica

Nós mostramos a formação de um homólogo funcional do complexo 9-1-1 na *Leishmania*, o qual apresenta semelhanças com a resposta canônica ao dano do DNA após o estresse de replicação, e a manutenção do genoma com o complexo dos eucariotos superiores (Damasceno, Nunes et al. 2013, Damasceno, Obonaga et al. 2016). Através de análises bioquímicas, mostramos também que as três subunidades

do complexo 9-1-1 são recrutadas para a cromatina em resposta ao estresse de replicação. Além disso, as proteínas Hus1 e Rad9 são requeridas para a manutenção dos telômeros e a eficiente resposta ao estresse de replicação.

No entanto, apesar das características conservadas de funcionalidade do complexo 9-1-1 de *Leishmania* com complexo dos eucariotos superiores, nós encontramos que este complexo na *Leishmania* apresenta uma divergência significativa como observado no modelamento estrutural de suas subunidades, na qual a estrutura terciária predita da região carboxi-terminal de Rad9 e Rad1 é notavelmente diferente da estrutura cristalográfica para os homólogos de outros eucariotos (Damasceno, Obonaga et al. 2016).

Por outro lado, embora os dados indiquem a participação destas proteínas em vias similares, as análises fenotípicas das células deficientes das proteínas Hus1 ou Rad9 mostram uma divergência marcada das subunidades dos homólogos do complexo 9-1-1. Nós observamos que níveis diminuídos de Rad9 ou Hus1 não só afetam a proliferação, mas também interferem na progressão do ciclo celular, resposta a diferentes tipos de estresse de replicação, drogas que induzem DSB, homeostase dos telômeros e nível de dano no DNA detectado pela histona fosforilada H2A (Damasceno, Nunes et al. 2013, Damasceno, Obonaga et al. 2016). Curiosamente, as deficiências destas proteínas levaram a fenótipos diferentes e opostos, sugerindo que estas proteínas são requeridas para o apropriado reparo da DSB e que estas subunidades diferem consideravelmente nas suas funções, além da formação do complexo canônico na *Leishmania*.

Como comentamos anteriormente, estudos recentes têm demonstrado que as proteínas Hus1 e Rad9 são requeridas na recombinação homóloga em outros eucariotos (Ngo, Balakrishnan et al. 2014, Ngo and Lydall 2015). Desta forma, podemos especular que estas proteínas podem atuar também no mecanismo de recombinação homóloga na *Leishmania*, o qual é o instrumento fundamental para a amplificação gênica além de sua participação na resposta ou DSB.

Conhecemos que os mecanismos propostos para a amplificação gênica são baseados na recombinação homóloga entre sequências repetitivas que se encontram espalhadas pelos cromossomos do parasita, permitindo rearranjar o seu genoma frequentemente e estocasticamente através dessas sequências repetitivas (Ubeda,

Legare et al. 2008, Ubeda, Raymond et al. 2014). Além disso, é razoável esperar que as proteínas principais que atuam na recombinação homóloga e o reparo do DNA por este mecanismo como a recombinasse Rad51 e a nuclease MRE11, tenham uma função vital neste fenômeno de amplificação gênica (Laffitte, Genois et al. 2014, Ubeda, Raymond et al. 2014).

No entanto, devido ao fato de que as ações das proteínas de reparo são determinadas pela capacidade das células de detectar e sinalizar o dano, as características peculiares das subunidades do complexo 9-1-1 poderiam estar relacionadas à plasticidade genômica no gênero *Leishmania*. Desta maneira, dada a relevância do complexo 9-1-1 na manutenção da estabilidade genômica na *Leishmania*, nós decidimos investigar a participação das proteínas Hus1 e Rad9 deste complexo no fenômeno de amplificação gênica neste parasita, o que permitirá contribuir à compreensão das bases moleculares de sua plasticidade genômica.

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultivo de Formas Promastigotas

A linhagem selvagem de *L. major* LT252 (MHOM/IR/84/LT252), as linhagens celulares deficientes das proteínas Hus1 ou Rad9 derivadas da linhagem selvagem, e as linhagens celulares resistentes ao metotrexato (MTX) derivadas das linhagens deficientes das proteínas Hus1 ou Rad9, eram cultivadas como formas promastigotas no meio de cultura M199 1X (Sigma-Aldrich) suplementado com HEPES 0,04M; adenina 0,1mM; biotina 50µg/mL; hemina 250µg/mL e soro fetal bovino a 10% inativado à 56°C e mantidas a 26°C. A linhagem deficiente para a proteína Hus1 foi cultivada em presença de 40µg/mL de nourseotricina (SAT) e a linhagem deficiente para Rad9 foi cultivada em presença de 16µg/mL de higromicina (Hyg) em todos os experimentos. As linhagens deficientes das proteínas Hus1 ou Rad9 seleccionadas em MTX, eram cultivadas em presença de SAT e Hyg nas concentrações descritas acima e mantidas em MTX nas concentrações nas quais foram seleccionadas.

2.2. Geração de Linhagens Resistentes a MTX

A geração das linhagens celulares de *L. major* resistentes a MTX eram feitas usando um protocolo de seleção por incremento gradual da droga ou seleção passo a passo (Coderre, Beverley et al. 1983). 1×10^5 células/mL eram inoculadas em meio contendo MTX e quando a densidade celular atingia 1×10^7 células/mL ou crescimento estacionário, as células eram transferidas a meio fresco contendo a mesma concentração do MTX. Após cinco passagens as células eram inoculadas na próxima concentração do MTX. As concentrações do MTX usadas foram 10, 20, 50, 100 e 500µM. As seleções também eram feitas em células expostas previamente a estresse replicativo. Neste caso, as células eram transferidas para meio contendo 10mM de HU por 15h antes da seleção em MTX.

2.3. Contagem das Formas Promastigotes e Curvas de Crescimento

A densidade das culturas era determinada por contagem das células em câmara de Neubauer. No caso de densidades maiores a 5×10^6 células/mL, as células eram diluídas 1:10 usando meio M199 1X.

As curvas de crescimento eram realizadas ajustando a densidade dos promastigotas a 1×10^5 células/mL no dia zero. A partir de este dia, a densidade era registrada diariamente por pelo menos seis dias consecutivos. O gráfico foi construído considerando a densidade media de pelo menos três experimentos independentes. Todos os gráficos de curvas de crescimento foram feitos no programa *Graph Pad Prism v6*.

2.4. Obtenção de Extratos de Proteínas Totais

As células eram coletadas por centrifugação a 1400g por 5min, lavadas com PBS 1X e suspendidas em tampão de amostra (Tris 50mM pH 6,5; DTT 10mM; azul de bromofenol 0,1% (m/v), glicerol 10% (m/v)) para uma densidade de 1×10^5 células/ μ L. Para separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições denaturantes (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, *SDS-PAGE*), a amostra era incubada a 90°C durante 10min e 10-20 μ L do extrato foi aplicado no gel. A separação das proteínas era feita por SDS-PAGE usando gel de poliacrilamida 10% e tampão de corrida (Tris 25mM, glicina 250mM, SDS 0,1% (m/v) pH 8,5).

2.5. Western Blotting

Apos a separação por SDS-PAGE, as proteínas eram transferidas para membrana *PDVF 0.45 (Amersham)* usando o equipamento de transferência semi-seca *TE 70 PWR (Amersham)* com corrente elétrica constante de 50mA por 2h e 30min, em tampão de transferência (Tris 24mM; glicina 192mM; metanol 20% (v/v)). Apos a transferência, a membrana era cortada para ser sondada por diferentes anticorpos primários. As frações de membrana eram bloqueadas com solução de bloqueio (PBS 1X, Tween-20 0,1% (v/v), leite desnatado 10% (m/v)) por 1h a temperatura ambiente e incubadas com diferentes anticorpos primários preparados

em solução de diluição do anticorpo (PBS 1X, Tween-20 0,1% (v/v), leite desnatado 3% (m/v)) por 2h. As diluições e anticorpos primários purificados a partir de coelho usados neste trabalho eram: 1:1000 para anti-Hus1 e 1:2000 para anti-Rad9 (Damasceno, Nunes et al. 2013, Damasceno, Obonaga et al. 2016). O anticorpo comercial anti-EF1 α (*Roche*) purificado a partir de camundongo era usado como controle de carga da quantidade do extrato numa diluição de 1:30000.

Após a incubação com o anticorpo primário, as frações de membrana eram lavadas quatro vezes com uma solução de lavagem de PBS-T (Tween-20 0,1 % (v/v) em PBS 1X) por 5 min cada lavagem. A seguir, as frações de membrana sondadas com anti-Hus1 e anti-Rad9 eram incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (*KPL, Gaithersburg MD*). Para a fração da membrana sondada com anti-EF1 α , o anticorpo anti-camundongo conjugado com peroxidase era usado (*GE, Healthcare UK, limited*). Os anticorpos secundários eram preparados em solução de diluição do anticorpo usando uma diluição 1:30000 e a membrana era incubada por 2h. Após a incubação, as frações de membrana eram lavadas quatro vezes com PBS-T por 5min cada lavagem. Após retirar o excesso de tampão, a membrana era incubada com 1mL do reagente de detecção *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham)*. Finalmente, a membrana era exposta a filme foto-sensível, *Hyperfilm ECL (Amersham)* de 1-5min. Após revelação manual, os filmes eram digitalizados usando um scanner *HP Scanjet G2710*.

2.6. Eletroforese do DNA em Gel de Agarose

Os fragmentos do DNA gerados por PCR convencional ou por análises de restrição eram separados em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1X (Tris-Acetato 0,04 M; EDTA 0,0001 M). Os fragmentos menores de 500pb eram separados em gel de agarose 2%. Os géis eram corados com 1mg/mL de brometo de etídio preparado em água e mantido em agitação constante por 30min. O DNA foi observado em luz UV e as imagens foram adquiridas no fotodocumentador de géis *DigiDoc-It™ Imaging System*, UVP usando o programa *Doc It LS image analysis software*.

2.7. Preparação das Amostras para Eletroforese em Gel em Campo Pulsado (*Pulsed field gel electrophoresis*, PFGE)

A preparação das amostras foi feita como descrito por Beverley com algumas modificações (Beverley 1988). As células eram coletadas por centrifugação a 1400g por 5 min e suspendidas na densidade de 4×10^8 células/mL em meio M199 2X sem adição de soro fetal bovino. A esta suspensão, foi adicionado o mesmo volume de tampão de preparo dos cromossomos (NaCl 130mM; Na_2HPO_4 142mM; NaH_2PO_4 8mM; glicose 2% (m/v)) contendo agarose de baixo ponto de fusão (*low-melting*) a 2% (m/v). Esta mistura, mantida aquecida a 50°C, foi distribuída em alíquotas de 63µL em moldes acrílicos que eram incubados no gelo por 20min para gelificação. Os blocos de agarose gelificados (*plugs*) eram transferidos para uma solução de lise (EDTA 0,5M pH 9; SDS 1%; proteinase K 0,5mg/mL) e mantidos por 48h a 50°C. A seguir, a solução de lise era trocada por uma solução de Tris/EDTA (Tris-HCl 200mM; EDTA 100mM) mantendo os *plugs* em agitação constante. Esta solução era trocada por solução fresca cada 12h. Os *plugs* mantidos nesta solução de Tris/EDTA, eram armazenados a 4°C até a separação dos cromossomos por eletroforese em gel em campo pulsado.

2.8. Separação dos Cromossomos por Eletroforese em Gel em Campo Pulsado (*Pulsed field gel electrophoresis*, PFGE)

Os cromossomos de *L. major*, preparados como descrito no item anterior, eram separados por PFGE em tampão TBE 0,5X (Tris 0,045 M; ácido bórico; 0,045M; EDTA 0,001M) em gel de agarose a 1% (m/v). A eletroforese era feita em *CHEF MAPPER* (BioRad) a 4,5V/cm a 14°C com um tempo de pulso de 120s por 48h. Os cromossomos no gel eram corados com 1mg/mL de brometo de etídio por 30min. As imagens foram adquiridas no fotodocumentador de géis *DigiDoc-It™ Imaging System*, UVP usando o programa *Doc It LS image analysis software*.

2.9. Southern Blotting

Após a separação dos cromossomos os géis de PFGE foram depurinizados em HCL 0,25M por 30min sob agitação constante, com uma troca da solução aos 15min. O gel era então tratado em solução de desnaturação (NaCl 1,5M; NaOH 0,5M) por 1h em agitação constante com uma troca da solução aos 30min. Após a desnaturação, o gel era neutralizado em solução de neutralização (NaCl 1,5M; Tris-HCl 0,5M pH 7,0) por 1h em agitação constante com uma troca da solução aos 30min. O DNA era transferido para uma membrana *Hybond-N+ membrane (Amersham)* por capilaridade com solução SSPE 10X por 48h (Sambrook, Russell 2001). O DNA foi fixado na membrana mediante a exposição à luz UV por 2min e guardada a temperatura ambiente até a hibridização. Para a hibridização, a membrana era bloqueada com tampão de hibridização (NaCl 0,5M, reagente de bloqueio 4% (w/v), solução de hibridização (v/v)) mínimo por 1h antes da adição da sonda. A sonda de hibridização era preparada com um fragmento de DNA desnaturado complementar à região do DNA a ser detectado o qual era conjugado com a enzima fosfatase alcalina, usando o sistema de detecção *AlkPhos Direct Labeling and Detection System e CDP-Star (Amersham)* seguindo as instruções do fabricante. A sonda era diluída no tampão de hibridização (NaCl 0,5M, reagente de bloqueio 4% (w/v), solução de hibridização (v/v)) e posteriormente adicionada na membrana. A temperatura de hibridização usada nos experimentos era de 60°C. A detecção do sinal quimioluminescente era feita mediante a exposição da membrana a filme foto-sensível *Hyperfilm ECL (Amersham)* de 3-6h, e os filmes revelados manualmente eram digitalizados usando o scanner *HP Scanjet G2710*.

2.10. Geração dos Fragmentos de DNA para Serem Usados como Sondas no Southern Blotting

A detecção do gene *DHFR-TS* nos cromossomos e em elementos extra cromossômicos, era feita pela hibridização das membranas com a sequência de todo o gene *DHFR-TS* (1500pb) amplificado por PCR convencional usando os seguintes oligonucleotídeos: *DHFR-TS Flank1 Forward* (5'-ATG**CCCGGG**CATATGTCCA-GGGCAGCTGCGAGGTTT-3') e *DHFR-TS Flank2 Reverse* (5'-ATG**CCCGGG**-CATATGCTATACGGCCATCTCCATCTT-3'), contendo os sítios de restrição para *XmaI* (indicado em negrito) e *NdeI* (indicado pelo sublinhado). A detecção de

sequências teloméricas era feita usando um fragmento de 300pb contendo a repetição telomérica de *Trypanosoma brucei* TTAGGG, obtida por digestão da construção pTEL (Van der Ploeg, 1984) com a enzima de restrição HindIII. O produto de PCR e o fragmento liberado por digestão enzimática foram purificados com *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* seguindo as instruções do fabricante.

2.11. Detecção do Número de Cópias dos Genes da *DHFR-TS* e *PTR1* por PCR Quantitativa

A variação do número de cópias da *DHFR-TS* e *PTR1* era detectada e medida por PCR quantitativa em tempo real. Um fragmento de 100pb do gene *DHFR-TS* foi amplificado usando os oligonucleotídeos *DHFR-TS.For.1 forward* (5'-CATCGA-GACAGCGTATTGCG-3') e *DHFR-TS.Rev.1 reverse* (5'-GATGCGGGTCAGGTACACTT-3'); e outro fragmento de 101pb do gene *PTR1* usando os oligonucleotídeos *PTR1.For.1 forward* (5'-AGCCCTGTGTCTGGAGATAGA-3') e *PTR1.Rev.1 reverse* (5'-ATGCGCGAACGCCTTAATC-3'). Para a normalização da massa total do DNA, um fragmento de 101pb do gene *G6PDH* usado como referencia era amplificado com os oligonucleotídeos *G6PDH.For.1 forward* (5'-ACCGCATTGACCACTACCTC-3') e *G6PDH.Rev.1 reverse* (5'-GATGTTGTTCGAGTTCCAC-3'). Todos os oligonucleotídeos foram desenhados com o programa *Primer Blast* (NCBI).

A mistura de reação para PCR quantitativa foi preparada com: 4µL dos parasitas em meio de cultura fervidos a 95°C por 5min; 10µL de *GoTaq® qPCR Master Mix*, 2X (Promega); 0,2µL do corante *CXR reference dye*; 0,6µL de cada oligonucleotídeo (concentração final na reação de 300nM) e completado a um volume final de 20µL com água ultra pura. A amplificação e as determinações em tempo real foram feitas no equipamento *7500 Real Time PCR system* (*Applied Biosystems*) usando as seguintes condições de ciclagem: 50°C por 2 min, 95°C por 2 min, 40 ciclos de 95°C por 15s, 60°C por 15s, 72°C por 1min. Ao final da ciclagem, uma *melting curve* era obtida por aquecimento dos produtos de PCR a 95°C por 15 s e esfriamento a 60°C por 1min. As reações eram feitas em triplicata e incluíam um controle negativo para os reagentes de PCR e um controle positivo para a amplificação de *DHFR-TS* ou *PTR1*. O *threshold cycle value* (*Ct*), era calculado automaticamente para cada amostra pelo programa *7500 Real Time PCR* (*Applied Biosystems*). A eficiência da PCR para

cada par de oligonucleotídeos foi avaliada pelo uso de diluições seriadas do extrato celular da cultura (10^2 - 10^5). Os valores de Ct eram analisados por quantificação relativa usando o método do $\Delta\Delta Ct$ (Livak and Schmittgen 2001).

2.12. Detecção da Incorporação de IdU em Células na Fase de Síntese do DNA Mediante Citometria de Fluxo.

Formas promastigotas de *L. major* em crescimento exponencial ($2-3 \times 10^6$ células/mL) eram incubadas com $100 \mu\text{M}$ do análogo da timidina IdU por 30min a 26°C e protegidas da luz direta. As células eram então coletadas por centrifugação a $1400g$ por 5min e lavadas uma vez com PBS 1X. As células eram fixadas com etanol a 70% (v/v) em PBS 1X e mantidas a 20°C por, no mínimo, 16 h. Após este tempo, as células eram lavadas com BSA 1% (w/v) em PBS 1X, centrifugadas a $1400g$ por 5min, suspensas em $250 \mu\text{L}$ de HCL 2M e incubadas nesta solução por 20min a temperatura ambiente. A seguir, 1mL de tampão fosfato 0,2M ($0,2\text{M Na}_2\text{HPO}_4$, $0,2\text{M KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,4) era adicionado diretamente na suspensão das células e imediatamente centrifugadas a $1400g$ por 5min. As células eram então incubadas em 1mL de tampão fosfato por 30min, centrifugadas a $1400g$ por 5min e processadas para detecção do IdU.

A detecção do IdU usou o anticorpo monoclonal anti-BrdU, clone B44 (*Purified mouse anti-BrdU Clone B44, BD Biosciences*) (Gratzner 1982). O anticorpo era diluído 1:300 em tampão de diluição do anticorpo (BSA 1% (w/v) em PBS 1X, Tween-20 0,2% (v/v)) e $60 \mu\text{L}$ desta preparação eram usados para suspender as células. Após 1h de incubação à temperatura ambiente e protegidas da luz direta, as células eram lavadas com solução de lavagem (BSA 1% (w/v) em PBS 1X) e incubadas com o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com alexa fluor 488 usando uma diluição 1:500 no mesmo tampão. As células eram suspensas em $60 \mu\text{L}$ do anticorpo diluído e incubadas por mais 1h. Depois de lavar as células com solução de lavagem, as células eram suspensas numa solução de PBS 1X contendo iodeto de propídeo $10 \mu\text{g/mL}$ e RNase $20 \mu\text{g/mL}$ e incubadas por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, as células eram transferidas para tubos *BD Falcon™ tube* (BD Biosciences) através de uma malha de nylon de $60 \mu\text{M}$ (Merck Millipore) antes da análise por citometria de fluxo.

2.13. Identificação do DNA de Fita Simples (*single strand DNA, ssDNA*) por Citometria de Fluxo: Detecção da Incorporação de IdU em Condições Não Desnaturantes

Formas promastigotas de *L. major* em crescimento exponencial (5×10^5 células/mL) eram incubadas com $100 \mu\text{M}$ do análogo da timidina IdU por 15 h a 26°C e protegido da luz direta. A seguir, as células eram coletadas por centrifugação a $1400g$ por 5min. Uma alíquota da cultura era separada previamente, lavada com PBS 1X e fixada com etanol 70% (v/v) em PBS 1X gelado (controle não tratado). Os promastigotas da cultura restante eram lavados com meio fresco e cultivadas em meio M199 1X contendo HU 10mM por 15h. Após este tempo, as células eram coletadas por centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. Novamente, uma alíquota da cultura era separada previamente, lavada com PBS 1X e fixada com etanol 70% (v/v) em PBS 1X. Os parasitas da cultura restante eram lavados com meio fresco e cultivadas em meio M199 1X sem adição da HU por até 36h. Durante este período, as células foram coletadas em 6h, 12h, 18h e 36h, lavadas com PBS 1X e fixadas com etanol 70% (v/v) em PBS 1X. Após a fixação, as células eram mantidas a 20°C por, no mínimo, 16h. A seguir as células eram centrifugadas a $1400g$ por 5min, lavadas com BSA 1% (w/v) em PBS 1X e processadas para a detecção do DNA de fita simples.

Para a detecção da incorporação do IdU no DNA de fita simples, se seguiu o mesmo protocolo descrito anteriormente na detecção do IdU em células na fase da síntese do DNA. A detecção do IdU era feita usando o anticorpo monoclonal anti-BrdU, diluído 1:300 em tampão de diluição do anticorpo (BSA 1% (w/v) em PBS 1 X, Tween-20 0,2% (v/v)). As células eram suspendidas em $60 \mu\text{L}$ do anticorpo diluído e incubadas por 1h a temperatura ambiente protegidas da luz direta. Após da incubação, as células eram lavadas com solução de lavagem (BSA 1% (w/v) em PBS 1X) e incubadas com o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com alexa fluor 488 e diluído 1:500 no tampão de diluição do anticorpo. As células eram suspendidas em $60 \mu\text{L}$ do anticorpo diluído e incubadas por mais 1h. Finalmente, as células eram lavadas com solução de lavagem, suspendidas em uma solução de PBS 1X contendo iodeto de propideo $10 \mu\text{g/mL}$ e RNase $20 \mu\text{g/mL}$ e incubadas por 30min a temperatura ambiente. As células eram transferidas para tubos *BD Falcon™ tube* (BD Biosciences) através de uma malha de nylon de $60 \mu\text{M}$ (Merck Millipore) antes da análise por citometria de fluxo.

2.14. Detecção da γ H2A por Citometria de Fluxo

Os formas promastigotas de *L. major* em crescimento exponencial ($2-3 \times 10^6$ células/mL), eram cultivados em meio M199 1X contendo HU 10mM por 15h. A seguir, as células eram coletadas por centrifugação a 1400g por 5min. Uma alíquota da cultura foi separada previamente e os parasitas lavados com PBS 1X e fixados com etanol 70% (v/v) gelado. As células da cultura restante eram lavados com meio fresco e cultivados em meio M199 sem adição de HU por até 36h, coletando uma alíquota da cultura a cada 6h. As células coletadas em cada ponto eram lavadas com PBS 1X, fixados com etanol gelado 70% (v/v) em PBS 1X e mantidos a -20°C por no mínimo 16h. No momento do processamento para a detecção da γ H2A, as células eram centrifugadas a 1400g por 5min e lavadas com BSA 1% (w/v) em PBS 1X.

A detecção da γ H2A era feita usando o anticorpo anti- γ H2A. Este anticorpo anti- γ H2A foi gerado por imunização de coelho com o fosfopeptídeo KHAKA [pT] PSV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) (Glover and Horn 2012). O soro foi purificado por afinidade usando o peptídeo correspondente como isca. Este anticorpo era usado numa diluição 1:300 em tampão de diluição do anticorpo (BSA 1% (w/v) em PBS 1X, Tween-20 0,2% (v/v)). As células eram suspendidas em 60 μ L do anticorpo diluído e incubadas por 1h a temperatura ambiente. Após a incubação, as células eram lavadas com solução de lavagem (BSA 1% (w/v) em PBS 1X) e incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com alexa fluor 488 diluído 1:500 no tampão de diluição do anticorpo. As células eram suspendidas em 60 μ L do anticorpo diluído e incubadas por mais 1h. Finalmente, as células eram lavadas com solução de lavagem, suspendidas em uma solução de PBS 1X contendo iodeto de propídeo 10 μ g/mL e RNase 20 μ g/mL e incubadas por 30min a temperatura ambiente. As células eram transferidas para tubos *BD Falcon™ tube* (BD Biosciences) através de uma malha de nylon de 60 μ M (Merck Millipore) antes da análise por citometria de fluxo.

2.15. Instrumentação e Análises dos Dados da Citometria de Fluxo

As células eram analisadas usando o citometro de fluxo *BD FACSCanto™ II* (Beckton Dickinson) equipado com laser de excitação em 488 nm e o programa *BD FACSDiva™* (Beckton Dickinson). A detecção do alexa fluor 488 era feita usando um

filtro de emissão verde (530/30 nm) e a detecção do iodeto de propídeo (*PI*) era feita usando um filtro de emissão vermelho (630/22 nm). Todos, a dispersão frontal (*forward scatter*) (FSC), dispersão lateral (*side scatter*) (SSC), emissão do PI e emissão do alexa fluor 488, eram registradas pelo programa *BD FACSDiva™*.

As análises dos dados da citometria de fluxo eram conduzidas no programa FlowJoX v10.0.7 (Tree Star, Inc). A população celular de *Leishmania* foi identificada baseada nas propriedades da dispersão da luz no gráfico composto por FSC versus SSC. Os agregados celulares eram excluídos da análise por uma seleção apropriada dos sinais fluorescentes num gráfico composto pela área do PI (*PI-Area*) versus largura do PI (*PI-Width*). As células marcadas (incorporação do IdU em células que sintetizam DNA, IdU nativo e γ H2A) eram observadas num gráfico bivariado composto pela área da fluorescência do alexa fluor 488 (Alexa 488-A) versus a área da fluorescência do PI (PI-A). Os histogramas do conteúdo de DNA eram observados num gráfico univariado composto pelo histograma versus PI-A.

2.15.1. Identificação de células na fase S

As células em fase S eram identificadas pela delimitação basal de fluorescência fornecida por um controle negativo, na qual acima do limite, a células estariam incorporado o IdU e conseqüentemente poderiam ser classificadas como células em fase de síntese do DNA. O controle negativo, foi composto por células pulsadas com IdU por 30min e processadas com anticorpo secundário (alexa fluor 488) em ausência do anticorpo primário (anti-BrdU) e em condições de desnaturação com HCL, da mesma forma que o processamento das demais amostras. A partir deste limite de fluorescência basal, desenhemos um *gate* para delimitar a população fluorescente ou população em fase S o qual era copiado para todas as amostras dentro do mesmo grupo de células permanecendo inalterável no seus parâmetros de: altura, largura e deslocamento no eixo y.

Para a identificação das células em *early S*, *middle S* e *late S*, as células em fase G1, S e G2/M eram calculadas automaticamente pelos algoritmos do módulo do ciclo celular do programa FlowJo. Tendo em consideração os valores calculados, as populações celulares em fase G1, S e G2/M eram identificadas manualmente usando quadros de seleção independente da incorporação do IdU no gráfico bivariado (Alexa fluor 488-A versus PI-A). Estas novas seleções foram feitas na sobreposição com a

seleção das células com incorporação do IdU descrita anteriormente, dando como resultado 6 subpopulações. Assim, as células com incorporação do IdU e conteúdo do DNA próximo à fase G1 eram classificadas como células em *early S* ou células que estão entrando na fase de síntese do DNA, as células com incorporação do IdU e conteúdo do DNA $> G1$ e $< G2/M$ eram classificadas como células em *middle S* ou células que estão no ponto médio da fase de síntese do DNA; e células com incorporação do IdU e conteúdo do DNA próximo à fase G2/M eram classificadas como células em *late S* ou células que estão deixando a fase S e entrando na fase G2/M.

A porcentagem de células em *early S*, *middle S* e *late S* relativa à fase do ciclo celular era calculada como a razão entre as células fluorescentes que incorporaram o análogo da timidina no total de células com o mesmo conteúdo do DNA (células com incorporação do IdU + células sem incorporação de IdU) durante o pulso do IdU expressado como fração de 100.

2.15.2. Identificação de células com DNA de fita simples

As células com DNA de fita simples eram identificadas pela delimitação da fluorescência fornecida por um controle negativo, na qual acima deste limite, as células teriam DNA de fita simples. O controle negativo, foi composto por células incubadas com IdU por 15h e processadas com anticorpo secundário (alexa fluor 488) em ausência de ambos, do anticorpo primário (anti BrdU) e de desnaturação. A partir deste limite de fluorescência basal desenhamos um *gate* para delimitar a população fluorescente ou população com DNA de fita simples o qual foi copiado para todas as amostras dentro do mesmo grupo de células e permanecendo inalterável nos seus parâmetros de: altura, largura e deslocamento no eixo y.

Para a identificação das células com DNA de simples fita em cada uma das fases do ciclo celular, a porcentagem das células em fase G1, S e G2/M eram calculadas automaticamente usando os algoritmos do módulo do ciclo celular pelo programa FlowJo. A partir destes valores, as populações celulares em fase G1, S e G2/M eram identificadas manualmente usando quadros de seleção no gráfico bivariado (Alexa fluor 488-A versus PI-A). Estes quadros de seleção eram feitos na sobreposição com a seleção das células com DNA de simples fita total descrita anteriormente, dando como resultado 6 subpopulações. Desta forma, as células com

marcação positiva para alexa fluor 488 e conteúdo do DNA próximo à fase G1 eram classificadas como células com DNA de simples fita na fase G1; as células com marcação positiva para alexa fluor 488 e conteúdo do DNA $> G1$ e $< G2/M$ eram classificadas como células com DNA de simples fita na fase S; as células com marcação positiva para alexa fluor 488 e conteúdo do DNA próximo à fase G2/M eram classificadas como células com DNA de simples fita na fase G2/M.

A porcentagem de células com DNA de fita simples relativo à fase do ciclo celular era calculada como a razão entre as células marcadas com alexa fluor 488 no total de células com o mesmo conteúdo do DNA expressado como fração de 100.

2.15.2. Identificação de células com γ H2A

A identificação das células com γ H2A em cada uma das fases do ciclo celular era feita seguindo o mesmo procedimento descrito para a identificação de células com DNA de simples fita. Primeiro, a porcentagem das células em fase G1, S e G2/M era calculada mediante o módulo de ciclo celular pelo programa FlowJo. Usando estes valores calculados, as populações celulares em fase G1, S e G2/M eram identificadas usando quadros de seleção no gráfico bivariado (Alexa fluor 488-A versus PI-A). As seleções eram feitas na sobreposição com a seleção das células com γ H2A, dando como resultado 6 subpopulações. As células com marcação positiva para alexa fluor 488 e conteúdo do DNA próximo à fase G1 eram classificadas como células com γ H2A na fase G1; as células com marcação positiva para alexa fluor 488 e conteúdo do DNA $> G1$ e $< G2/M$ eram classificadas como células com γ H2A na fase S; as células com marcação positiva para alexa fluor 488 e conteúdo do DNA próximo à fase G2/M eram classificadas como células com γ H2A na fase G2/M.

A porcentagem de células com γ H2A relativo à fase do ciclo celular era calculada como a razão entre as células marcadas com alexa fluor 488 no total de células com o mesmo conteúdo do DNA expressado como fração de 100.

2.16. Separação de Células Activadas pela Fluorescência e Preparo das Amostras para Sequenciamento

Formas promastigotas das linhagens selvagem e deficientes para as proteínas Hus1 ou Rad9, eram cultivadas em meio *Eagle's* modificado (designado como meio

HOMEM, GE Healthcare) suplementado com 10% soro fetal bovino (Gibco, Life Technologies), e usado nos experimentos numa densidade de 5×10^6 células/mL. Aproximadamente 1×10^9 células/mL eram coletadas por centrifugação a 1400g por 5min, lavadas em PBS 1X suplementado com 5mM de EDTA (PBS 1X/EDTA) e fixados com metanol a 70% (v/v) em PBS 1X/EDTA e estocadas a 4°C. Para a separação celular (*sorting*), aproximadamente 3×10^9 células/mL foram coletadas por centrifugação a 1400g por 5min, lavadas com PBS 1X/EDTA, suspensas em solução de PBS 1X/EDTA contendo iodeto de propideo 10µg/mL e RNase A 10µg/mL (Sigma Aldrich) e incubadas a 37°C por 45min. A seguir, as células eram transferidas para tubos *BD Falcon™ tube* (BD Biosciences) através de uma malha de nylon de 35µm e separadas na fase G2/M mediante classificação celular ativada por fluorescência (*fluorescent activated cell sorting; FACS*) usando o equipamento *FACS Aria I™ cell sorter* (BD Biosciences). As células na fase G2/M eram centrifugadas a 1400g por 5min e o DNA genômico foi extraído usando *Blood and Tissue DNA extraction kit* (Qiagen). A concentração do DNA era determinada usando *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Life Technologies) e uma alíquota do DNA de cada amostra foi enviada para a preparação da biblioteca genômica e sequenciamento por illumina.

2.17. Análise de *Read Depth* para a Detecção da Variação do Número dos Cromossomos

As *reads* do sequenciamento foram mapeadas ao genoma de referência *L. major* friedlin com o programa MAQ v 0.7.1 (<http://maq.sourceforge.net/>) usando guias personalizadas em *Perl script*. O conjunto de *reads* foram analisadas em conjuntos pareados menores de $2,5 \times 10^6$ leituras e convertidos em formato binário. O número de bases mapeadas de cada posição em cada cromossoma foi registrado e usado para determinar o número total do mapeamento baseado em leitura para cada cromossomo, e a *read depth* média para cada cromossomo. Como a maioria dos cromossomos mostrou *read depth* média similar, e interpretando isto como uma ploidia nominal para as células, uma normalização de dois dentro do genoma foi feita definida pelo promeio da *read depth* dos quatro cromossomos mais cumpridos. A *read depth* para cada cromossomo foi subsequentemente normalizada a este valor.

2.18. Análises Estatísticas

A distribuição das amostras ou normalidade foi avaliada pelo teste de D'Agostino-Pearson. As diferenças estatisticamente significativas entre os diversos grupos foi estabelecida pelo teste de ANOVA ou Kruskal-Wallis dependendo de se as variáveis apresentavam distribuição normal ou distribuição não-normal, respectivamente. Após o teste de ANOVA, um teste de comparações múltiplas (test de Dunnett ou Turkey) foi usado para conhecer os grupos que apresentavam as diferenças encontradas. Assim, o teste de Turkey foi usado para a comparação entre as medias e o teste de Dunnett foi usado para a comparação das medias com relação a uma media controle. Todas as análises estatísticas e alguns gráficos (curvas de crescimento e gráficos de barras) foram gerados no programa Graph Pad Prism v6 (San Diego, CA). Os valores de p mostrados nos gráficos com o asterisco, são interpretados como: valor p de 0,01 a 0,05 = *; 0,001 a 0,01 = **, 0,0001 a 0,001 = ***, $<0,0001$ = ****.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Seleção da Linhagem WT e Linhagens Celulares Deficientes das Proteínas Hus1 ou Rad9 para Resistência ao MTX

Como comentamos anteriormente, o protozoário parasita *Leishmania* pode amplificar ou deletar regiões específicas do seu genoma em eventos que podem ser selecionados em resposta à pressão de drogas. Esta é uma estratégia para modular a expressão de genes específicos e superar aos desafios do seu meio ambiente. A seleção da *Leishmania* para resistência à MTX com frequência revela a amplificação de estruturas circulares extracromossomais ou estruturas lineares contendo os genes da *DHFR* ou *PTR1* que leva à produção aumentada da DHFR e PTR1 compensando a inibição da DHFR pelo MTX.

No intuito de conhecer se as proteínas do complexo 9-1-1, Hus1 e Rad9 participam na modulação de dosagem de genes em *Leishmania major*, nós selecionamos a linhagem WT e as linhagens deficientes das proteínas Hus1 ou Rad9, para a resistência a metotrexato (MTX), usando um protocolo de seleção de incremento gradual da droga até uma concentração de 500 μ M. Para isto, as células foram cultivadas no meio com a quantidade específica de MTX. Quando atingiram a fase logarítmica tardia foram transferidas a meio fresco contendo a mesma concentração de MTX. Após 5 passagens na mesma concentração de MTX para estabilizar o crescimento, as células foram cultivadas na próxima concentração de seleção de MTX. As concentrações de MTX usadas para a seleção foram 10, 20, 50, 100 e 500 μ M. Considerando que as proteínas do complexo 9-1-1, Hus1 e Rad9 participam na sinalização ao dano no DNA, nós selecionamos também a linhagem WT e linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 após a exposição a 10mM HU por 15h. A HU é uma droga que causa estresse de replicação por inibição da atividade da Ribonucleotídeo Reductase (Figura 11).

Figure 11. Geração das linhagens resistentes a MTX derivadas das linhagens deficientes das proteínas Hus1 ou Rad9. Representação esquemática da abordagem para a seleção gradual para resistência ao MTX. A linhagem WT e as linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 de *L. major* foram selecionadas para resistência ao MTX usando um protocolo de seleção gradual passo a passo seguida ou não da exposição a 10mM de HU por 15h. As concentrações de seleção no MTX usadas foram 10, 20, 50 100 e 500 µM. As células foram cultivadas no meio M199 1X contendo o MTX e transferidas a um meio fresco com a mesma quantidade de droga quando a cultura atingiu a fase logarítmica tardia. Após cinco passagens numa mesma concentração específica de MTX, as células foram expostas a uma concentração maior de MTX. P: passagem. As linhagens resistentes a cada concentração de MTX foram designadas como MTX 10, MTX 20, MTX 50, MTX 100 e MTX 500. As linhagens pretratadas com HU antes da seleção em MTX foram designadas como HU/MTX 10, HU/MTX 20, HU/MTX 50, HU/MTX 100 e HU/MTX 500. MTX: Metotrexato.

3.2. Análise do Crescimento Celular das Linhagens Resistentes ao MTX Previamente Expostas ou Não a HU

Com a intenção de saber se as células resistentes a MTX previamente expostas ou não a HU apresentaram alterações no seu perfil de crescimento após a seleção, nós construímos uma curva de crescimento para cada linhagem celular selecionada em MTX, monitorando a densidade celular diariamente e comparando os perfis de crescimento com as respectivas células não selecionadas usadas como controle.

As linhagens resistentes em cada etapa de seleção ao MTX derivadas da WT sem tratamento prévio com HU, mostraram densidades máximas de crescimento semelhante à parental não selecionado de $\sim 3,5 \times 10^7$ células/mL no terceiro dia (Figura 12A, esquerda). No entanto, nós observamos um atraso no crescimento destas linhagens resistentes a MTX, principalmente no primeiro e segundo dia, o qual foi mais pronunciado nas linhagens resistentes a maiores concentrações do MTX.

As linhagens celulares derivadas da linhagem deficiente da proteína Hus1 selecionadas em MTX e resistentes em cada etapa de seleção sem tratamento prévio com HU, mostraram também densidades máximas do crescimento semelhantes a linhagem deficiente da proteína Hus1 não selecionada de $\sim 1 \times 10^7$ células/mL, como apresentado na figura 12A (no centro). No entanto, como no caso das linhagens derivadas da WT resistentes ao MTX, as linhagens derivadas da linhagem Hus1+/- resistentes a MTX, apresentaram um atraso no crescimento até o terceiro dia, atingindo a densidade máxima no quarto dia.

As linhagens celulares selecionadas e resistentes em cada etapa de seleção no MTX, derivadas da linhagem deficiente da proteína Rad9 sem tratamento prévio com HU mostraram densidades do crescimento similares à linhagem Rad9+/- não selecionada de $\sim 2 \times 10^7$ células/mL, como apresentado na figura 12A (direita). Semelhante às linhagens resistentes derivadas da WT e Hus1+/-, as linhagens derivadas da linhagem Rad9+/- mostraram densidades de crescimento menores principalmente a partir da concentração de seleção de 50 μ M do MTX. No entanto, diferente daquelas linhagens, as densidades de crescimento foram menores nestas linhagens celulares derivadas da Rad9+/-.

As linhagens celulares selecionadas em MTX e resistentes em cada etapa de seleção, derivadas da WT que foi exposta previamente a HU, também mostraram

densidades máximas do crescimento semelhante à densidade da linhagem WT não selecionada, como apresentado na figura 12B (esquerda). No entanto, o atraso no crescimento nestas linhagens foi maior comparado com as linhagens derivadas desta mesma linhagem WT resistentes ao MTX sem o pré-tratamento com HU, atingindo uma densidade máxima de crescimento no quarto dia. Semelhante ao observado nas curvas de crescimento das linhagens selecionadas no MTX derivadas da WT sem o pré-tratamento com HU, as linhagens selecionadas as concentrações maiores do MTX derivadas da linhagem previamente exposta a HU, apresentaram um maior atraso no crescimento.

No caso das linhagens celulares selecionadas em MTX e resistentes em cada etapa de seleção derivadas da linhagem Hus1+/- previamente exposta a HU, encontramos um atraso no crescimento pouco pronunciado até o segundo dia. No terceiro dia, as linhagens mostraram densidades semelhantes com a linhagem não selecionada ($\sim 1 \times 10^7$ células/mL), como apresentado na figura 12B (no centro). No entanto, no quarto dia, as densidades destas linhagens foram $\sim 2 \times 10^7$, permanecendo constante até o sexto dia.

A diferença das linhagens celulares selecionadas no MTX derivadas da linhagem Rad9+/- sem exposição à HU, as linhagens celulares resistentes ao MTX derivadas desta mesma linhagem que foi previamente tratada com HU antes da seleção, mostraram um perfil do crescimento semelhante com a linhagem Rad9+/- não selecionada usada como controle, como observado na figura 12B (direita).

Estes resultados sugerem que a seleção das linhagens WT e linhagens deficientes de Hus1 e Rad9 no MTX, afetou a habilidade das células de replicar eficientemente na presença da droga. Observamos que este efeito aumentou a medida que a concentração de seleção de MTX foi elevada. No entanto, o pré-tratamento com HU antes da seleção permitiu nas linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 a reversão, em níveis variáveis, do custo necessário para atingir a resistência, possivelmente por mutações compensatórias favorecidas pelo estresse de replicação, além da possível falta da sinalização eficiente de dano no DNA causada pela ruptura do complexo 9-1-1 nestas células deficientes de Hus1 ou Rad9.

Figura 12. Análises do perfil de crescimento das linhagens resistentes a MTX derivadas da linhagem WT e linhagens deficientes das proteínas Hus1 ou Rad9. A) Curvas de crescimento das linhagens celulares selecionadas e resistentes ao MTX derivadas da linhagem WT (esquerda), derivadas da linhagem deficiente da proteína Hus1 (centro) e derivadas da linhagem deficiente da proteína Rad9 (direita). **B)** Curvas de crescimento das linhagens celulares selecionadas e resistentes ao MTX derivadas da linhagem WT (esquerda), derivadas da linhagem deficiente da proteína Hus1 (centro) e derivadas da linhagem deficiente da proteína Rad9 (direita) previamente tratadas com 10mM de HU por 15h antes da seleção. As linhagens resistentes em cada concentração do MTX foram designadas como MTX 10, MTX 20, MTX 50, MTX 100 e MTX 500. NS: não selecionada. HU (-) Sem exposição previa a hidroxureia; HU (+) Com exposição previa a hidroxureia antes da seleção no MTX.

3.3. Análise dos Níveis de Expressão das Proteínas Hus1 e Rad9 nas Linhagens Resistentes ao MTX Derivadas das Linhagens Hus1+/- e Rad9+/-

Com o objetivo de investigar se as linhagens selecionadas no MTX derivadas das linhagens deficientes das proteínas Hus1 ou Rad9 previamente expostas ou não ao estresse de replicação com HU continuaram apresentando níveis diminuídos destas proteínas, nós examinamos os níveis destas proteínas em uma análise de *western blotting* das linhagens resistentes ao MTX derivadas da WT, Hus1+/- e Rad9+/- previamente expostas ou não a HU em duas etapas de seleção, 50 e 500µM do MTX.

A análise de *western blotting* das linhagens celulares selecionadas e resistentes até 50µM e 500µM do MTX derivadas da WT, mostraram níveis de expressão das proteínas Hus1 e Rad9 semelhantes à parental não selecionada como esperávamos (Figura 13, esquerda). De forma semelhante, os níveis de expressão das proteínas nas linhagens celulares selecionadas até as mesmas concentrações do MTX derivadas da linhagem previamente exposta a HU, foram comparáveis com a linhagem WT controle.

As linhagens celulares selecionadas e resistentes até 50µM e 500µM do MTX derivadas da linhagem Hus1+/- exposta ou não a HU, mostraram um nível de expressão da proteína Hus1 comparável com a linhagem Hus1+/- não selecionada usada como controle, como apresentada na figura 13 (no centro). Em relação ao nível de expressão da proteína Rad9 nestas mesmas linhagens celulares, nós observamos que, a exceção da linhagem deficiente de Hus1 resistente até 50µM derivada da linhagem sem pré-tratamento com HU, o nível desta proteína foi reduzido nas linhagens resistentes ao MTX independente do pré-tratamento com a HU.

Por outro lado, a análise de *western blotting* das linhagens deficientes de Rad9 selecionadas até 50µM e 500µM do MTX derivadas da linhagem sem pré tratamento com HU, mostrou que estas linhagens apresentaram uma reversão do nível de expressão de Rad9 ao nível detectado na linhagem WT (Figura 13, direita, posição 3 e 4 na membrana).

Figura 13. Análise dos níveis de expressão das proteínas Hus1 e Rad9 mediante *Western blotting* na linhagem WT e linhagens deficientes para estas proteínas após a seleção no MTX previamente tratadas ou não com HU. O grafico mostra os nives de proteínas Hus1 e Rad9 das linhagens celulares selecionadas até 50 e 500µM do MTX derivadas da linhagem WT (direita), derivadas da linhagem deficiente de Hus1 (centro) e derivadas da linhagem deficiente de Rad9 (esquerda) pré tratadas ou não com 10mM de HU por 15h. Os anticorpos anti Hus1 e o anti Rad9, foram usados para detectar e quantificar os níveis das respectivas proteínas. O anticorpo anti-EF1α foi usado como controle de carga da quantidade do extrato total. O número embaixo de cada banda no *western blotting* indica o número de vezes em que a proteína está expressa nas linhagens selecionadas com relação à expressão da mesma proteína na linhagem WT. As linhagens resistentes até 50 e 500µM do MTX foram designadas como MTX 50 e MTX 500 e as linhagens resistentes ao MTX previamente tratadas com HU foram designadas como HU/MTX 50 e HU/MTX 500.

No entanto, o nível de expressão desta proteína nas linhagens selecionada até 50 μ M e 500 μ M do MTX derivadas também da linhagem gem deficiente de Rad9 exposta previamente a HU, foi reduzido como na linhagem Rad91+/- controle (Figura 13, direita, posição 5 e 6 na membrana). Em relação ao nível de expressão da proteína Hus1 nestas linhagens resistentes ao MTX derivadas da linhagem pré-tratada com HU, nós observamos um nível de expressão um pouco mais baixo do que a linhagem Rad9+/- controle e as linhagens selecionadas em MTX sem pré-tratamento com HU.

Estes resultados demonstram que a pressão de seleção da resistência ao MTX sem o pré-tratamento com HU causou nas linhagens resistentes a MTX derivadas da Rad9+/-, a reversão do nível de expressão desta proteína. No entanto, este mesmo processo de seleção não afetou o nível de expressão reduzida da proteína Hus1 na linhagem heterozigota para Hus1. Além disso, as células deficientes de Hus1 ou Rad9 expostas ao estresse de replicação antes da seleção no MTX, continuaram apresentando níveis reduzidos das respectivas proteínas independente da concentração de MTX usada no processo de seleção.

3.4. Quantificação do Número de Cópias da *DHFR-TS* e *PTR1* das Linhagens Resistentes ao MTX

Nós usamos uma estratégia baseada em PCR quantitativa para determinar a variação do número de cópias de genes específicos nas linhagens selecionadas no MTX derivadas das linhagens pré-tratadas ou não com HU. Para isto, nós medimos a variação do número de cópias dos genes da *DHFR-TS* e *PTR1* de cópia única em cada etapa de seleção em MTX. Estes genes são frequentemente encontrados amplificados como elementos extracromossomais em *L. major* submetida à seleção. O número de cópias das linhagens selecionadas em MTX foi calculado pelo método de quantificação relativa do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ usando o gene da *G6PDH* como referencia e a linhagem WT não selecionada como calibrador. Os resultados foram apresentados como *fold change* normalizados pelo gene endógeno e relativo à linhagem WT não tratada.

A análise mostrou que a linhagem WT resistente ao MTX apresentou um aumento no número de cópias do gene da *DHFR-TS* a partir da etapa de seleção de 50 μ M com 2,1 *fold* ($\pm 0,6$ *fold*) em média, com relação a linhagem WT não selecionada.

Na etapa de seleção de 100µM nós detectamos um incremento de 10,5 *fold* ($\pm 2,2$ *fold*) e na etapa de seleção de 500 µM de 42,2 *fold* ($\pm 1,3$ *fold*) em média, como apresentado na figura 14A (esquerda).

No caso da linhagem celular deficiente da proteína Hus1, nós observamos que o perfil de amplificação das células resistentes ao MTX foi notavelmente afetado pela deficiência desta proteína. Diferente das células WT resistentes ao MTX, a variação do número de cópias de *DHFR-TS* observado para as células deficientes de Hus1 resistentes ao MTX foi detectado na etapa de seleção de 500µM com 2,7 *fold* ($\pm 0,8$ *fold*) em média com relação à linhagem WT não selecionada (Figura 14A, no centro).

Por outro lado, nós observamos nas linhagens resistentes ao MTX derivadas da linhagem Rad9+/-, que a deficiência desta proteína também teve um efeito no perfil de amplificação observado. O aumento no número de cópias da *DHFR-TS* foi observado a partir de 100µM e não em 50µM como na linhagem WT resistente ao MTX. Nesta etapa de seleção o incremento no número de cópias detectado foi de 2,7 *fold* ($\pm 0,7$ *fold*) em média; 3,7 vezes menor ($10,5 / 2,7$) do que o incremento detectado na linhagem WT selecionada até a mesma concentração MTX. No entanto, na etapa de seleção de 500 µM, o número de cópias detectado em média foi de 129,4 *fold* ($\pm 28,1$ *fold*); 3,0 vezes maior ($129,4 / 42,3$) do que a variação detectada na linhagem WT resistente a esta mesma concentração (Figura 14A, esquerda).

Por outro lado, o tratamento com HU antes da seleção em MTX afetou o perfil de amplificação de maneira geral na linhagem selvagem e nas linhagens deficientes para Hus1 e Rad9. Assim, a linhagem WT resistente ao MTX pré-tratada com HU, mostrou um incremento no número de cópias da *DHFR-TS* a partir da etapa de seleção de 100µM com 2,4 *fold* ($\pm 0,4$ *fold*) em média. Na seleção de 500µM, o incremento em média detectado foi de 92,3 *fold* ($\pm 2,2$ *fold*), como mostrado na figura 14B (esquerda). Quando comparamos estas variações no número de cópias com a mesma linhagem WT não tratada com HU, nós observamos que a variação no número de cópias começou a ser detectado na etapa de 100µM e não na etapa de 50µM do MTX, como foi descrito anteriormente. Também observamos que o incremento nesta etapa de seleção de 100µM foi de 4,4 vezes menor ($10,5 / 2,4$), no entanto na etapa de seleção de 500µM, o incremento foi de 2,2 vezes maior ($92,3 / 42,2$) com relação à linhagem sem pré- tratamento. Estes resultados sugerem que a exposição ao

Figure 14. Análise de PCR quantitativa para a detecção do número de cópias do gene da *DHFR-TS* nas linhagens selecionadas no MTX. A) Número de cópias da *DHFR-TS* detectada nas linhagens resistentes ao MTX derivadas da linhagem WT (esquerda), derivadas da linhagem deficiente de Hus1 (no centro) e derivadas da linhagem deficiente de Rad9 (direita). B) Número de cópias da *DHFR-TS* detectada nas linhagens resistentes ao MTX derivadas da linhagem WT (esquerda), derivadas da linhagem deficiente de Hus1 (no centro) e derivadas da linhagem deficiente de Rad9 (direita) previamente tratadas com 10mM de HU por 15h. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes e mostra a média dos valores calculados e a desvio padrão.

estresse de replicação antes da seleção no MTX não favorece a amplificação do locus da *DHFR-TS* na linhagem WT em concentrações baixas do MTX, demonstrado pela detecção das amplificações contendo este locus predominantemente na última etapa de seleção nas células pré-tratadas comparado com as células não pré-tratadas, onde as amplificações começaram a ser detectadas em concentrações tão baixas do MTX como 50µM.

A linhagem deficiente de Hus1 resistente ao MTX pré-tratada com HU, mostrou um incremento no número de cópias da *DHFR-TS* em etapas de seleção tão baixas como 20µM com 6,7 *fold* ($\pm 0,8$ *fold*) em média. Na etapa de seleção de 50µM, o incremento foi 11,6 *fold* ($\pm 0,3$ *fold*); na etapa de seleção de 100µM o incremento foi de 13,4 *fold* ($\pm 1,7$ *fold*) e na etapa de seleção de 500µM o incremento foi de 37,6 *fold* ($\pm 10,6$ *fold*) em média (Figura 14B, no centro). Comparando o incremento no número de cópias com a mesma linhagem sem o pré-tratamento com HU na seleção de 500µM, nós encontramos que o incremento foi de ~14 vezes (37,6 / 2,7). O incremento com relação à linhagem WT resistente ao MTX na etapa de seleção de 100µM previamente tratada com HU foi 5,8 vezes maior (13,4 / 2,4), e na etapa de 500µM, a variação foi 2,5 vezes menor (92,3 / 37,6). Estes resultados sugerem que após o estresse de replicação, a amplificação gênica de baixo número de cópias que contem o locus da *DHFR-TS* é facilitada nas células deficientes de Hus1 comparada com as células WT.

A linhagem deficiente da proteína Rad9 resistente ao MTX pré-tratada com HU, mostrou um incremento no número de cópias da *DHFR-TS* em etapas de seleção tão baixas como 50µM com 95,6 *fold* ($\pm 13,6$ *fold*) em média. Na etapa de seleção de 100µM o incremento foi de 151,1 *fold* ($\pm 8,7$ *fold*) e na etapa de seleção de 500µM, o incremento foi de 156,8 *fold* ($\pm 13,6$ *fold*) em média, como observado na figura 14B (direita). Comparando o incremento no número de cópias com a mesma linhagem resistente ao MTX na etapa de 100µM sem tratamento prévio com HU, onde começou a ser detectada a variação do número de cópias nesta linha, o incremento foi de ~56 vezes (151,1 / 2,7), e na concentração de 500µM, o incremento foi de 1,2 vezes (156,8 / 129,4). O incremento com respeito a linhagem WT resistente ao MTX pré-tratada com HU na etapa de seleção de 100µM foi de 63 vezes (151,1 / 2,4) e na etapa de seleção de 500µM foi de 1,7 vezes (156,8 / 92,3). Estes resultados sugerem que, semelhante ao que acontece nas células deficientes de Hus1, após o estresse de

replicação, a amplificação gênica do locus da *DHFR-TS* é facilitada nas linhagens celulares deficientes de Rad9 comparada com a linhagem WT. No entanto, diferente das linhagens celulares deficientes de Hus1, a amplificação gênica que contem o locus da *DHFR-TS* nas linhagens celulares deficientes de Rad9 é detectado num alto número de cópias.

Por outro lado, nós exploramos também a variação do número de cópias do gene da *PTR1* nas linhagens selecionadas até 500 μ M do MTX, previamente expostas ou não a HU derivadas da linhagem WT e linhagens deficientes da proteína Hus1 ou Rad9. Nestas análises também utilizamos PCR quantitativa. A análise mostrou que, contrariamente ao locus da *DHFR-TS*, o locus da *PTR1* não apresentou variação no número de cópias nas linhagens resistentes ao MTX como observado na figura 15, sugerindo que a exposição gradual nesta droga somente favoreceu a seleção de estruturas amplificadas contendo a gene da *DHFR-TS* nas células resistentes ao MTX independentemente do pré-tratamento com HU.

3.5. Quantificação do Número de Cópias da *DHFR-TS* das Linhagens Resistentes ao MTX Previamente Expostas a CPT

Com intuito de conhecer se o efeito do pré-tratamento com HU no perfil de amplificação foi devido à resposta geral das forquilhas de replicação estressadas ou à inibição da atividade da ribonucleotídeo redutase, nós pré-tratamos a linhagem WT e a linhagem deficiente da proteína Hus1 por 15h com 2mM de CPT, uma droga citotóxica que causa estresse de replicação por inibição da topoisomerase I. Após o tratamento, selecionamos as células para resistência a MTX usando o mesmo protocolo de seleção em MTX descrito previamente. O número de cópias da *DHFR-TS* foi calculado pelo método de quantificação relativa do $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

A análise de quantificação do número de cópias mostrou que a linhagem WT resistente ao MTX previamente exposta a CPT apresentou um incremento no número de cópias da *DHFR-TS* detectado na ultima etapa de seleção de 500 μ M com 56,4 *fold* ($\pm 5,1$ *fold*) em média (Figura 16, esquerda). Comparando o número de cópias detectado com a linhagem WT resistente ao MTX sem tratamento prévio na mesma

Figure 15. Análise de PCR quantitativo do gene de *PTR1* para a detecção do número de cópias nas linhagens selecionadas no MTX. O gráfico apresenta o número de cópias do gene *PTR1* detectado nas linhagens resistentes até 500 μ M de MTX derivadas da linhagem WT e linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 pré-tratadas ou não com 10 mM de HU por 15h. Os gráficos são representativos de pelo menos dois experimentos independentes e mostra a média dos valores calculados e a desvio padrão. A linhagem celular SFR-30 foi usada como controle da amplificação do gene *PTR1*. Esta linhagem celular é uma linhagem selecionada e resistente a terbinafina a qual carrega estruturas amplificadas da região H contendo o gene da *PTR1*. As linhagens resistentes a 500 μ M do MTX foram designadas como MTX 500 e as linhagens resistentes ao 500 μ M do MTX previamente tratadas com HU foram designadas como 500 HU/MTX.

etapa de seleção, o incremento foi de 1,3 vezes (56,4 / 42,3). Semelhante à mesma linhagem resistente ao MTX pré-tratada com HU, um incremento de mais de 50,0 *fold* da *DHFR-TS* foi observado na última etapa de seleção.

No caso da linhagem celular deficiente da proteína Hus1, o pré-tratamento com CPT também favoreceu a variação do número de cópias da *DHFR-TS* em etapas de seleção tão baixas como 20µM de MTX, semelhante à mesma linhagem gem Hus1+/- resistente ao MTX previamente tratada com HU. O número de cópias detectadas nesta linhagem celular pré-tratada com CPT na etapa de seleção de 20µM foi de 3,1 *fold* ($\pm 2,3$ *fold*) em média. Nas etapas de seleção posteriores de 50, 100 e 500µM do MTX, o número de cópias detectado não excedeu em média 10,0 *fold* (Figura 16, direita).

Estes resultados sugerem que um mecanismo comum que responde ao estresse de replicação participa no favorecimento da formação das amplificações que contém o gene da *DHFR-TS* detectado em alto número de cópias, principalmente em altas concentrações de seleção no MTX para a linhagem WT, e detectado em baixo número de cópias na seleção para a linhagem deficiente de Hus1.

3.6. Caracterização da Natureza das Amplificações das Linhagens Selecionadas em MTX Expostas ou Não a HU

Baseados nos perfis de amplificação da *DHFR-TS* encontrados nas linhagens celulares deficientes para as proteínas Hus1 ou Rad9, nós decidimos investigar a natureza destas amplificações. Para isto nós analisamos o cariótipo das linhagens celulares resistentes em cada etapa de seleção ao MTX pré-tratadas ou não com HU usando a eletroforese em campo pulsado (*Pulse field gel electrophoresis*, PFGE) para separar os cromossomos. Estes cromossomos separados por PFGE foram depois caracterizados pela análise de *Southern blotting* usando a sequência do gene da *DHFR-TS* como sonda.

Após a separação dos cromossomos no PFGE nós encontramos que as linhagens celulares derivadas da linhagem WT resistentes em cada etapa de seleção ao MTX não mostraram alterações no cariótipo e a banda correspondente ao gene da *DHFR-TS* no cromossomo 6 foi detectada na análise de *Southern blotting* em cada

Figura 16. Análise de PCR quantitativo para a detecção do número de cópias do gene da *DHFR* nas linhagens selecionadas no MTX previamente tratadas com CPT. O gráfico apresenta o número de cópias detectadas nas linhagens resistentes ao MTX derivadas da linhagem WT (esquerda) e derivadas da linhagem deficiente de Hus1 (direita) previamente tratadas com 2mM de CPT por 15h antes da seleção no MTX. Os gráficos são representativos de pelo menos dois experimentos independentes e mostra a média dos valores calculados e a desvio padrão. CPT: Camptotecina.

uma das linhagens. Além disso, um padrão de hibridização em arraste foi identificado na linhagem resistente ao MTX na ultima etapa de seleção de 500 μ M, condizente com um incremento no número de cópias da *DHFR-TS* detectado na análise de PCR quantitativa para esta linhagem (Figura 17A, esquerda), sugerindo assim a presença de elementos circulares extra cromossômicos.

Semelhante as linhagens celulares derivadas da linhagem WT resistentes ao MTX, nós encontramos que as linhagens celulares derivadas da linhagem Hus1+/-, e resistentes em cada etapa de seleção ao MTX, não mostraram alterações no cariótipo. A banda correspondente ao locus da *DHFR-TS* no cromossomo 6 foi detectada na análise de *Southern blotting* em cada uma das linhagens celulares. Em adição a isto, e condizente com análise de PCR quantitativa, nós detectamos na linhagem resistente até 500 μ M do MTX, além da banda correspondente ao locus endógeno da *DHFR-TS*, uma banda de massa molecular entre 450 e 555Kb, contendo também o locus a *DHFR-TS*, como apresentado na figura 17A, (no centro). Baseado no baixo número de cópias (2,7 *fold* em média) detectado por PCR quantitativa e no padrão de migração observado no *Southern blotting*, esta amplificação é sugestiva de um elemento extra cromossômico linear contendo o locus da *DHFR-TS*.

Em relação às linhagens celulares resistentes em cada etapa de seleção ao MTX derivadas da linhagem deficiente de Rad9, o cariótipo observado no PFGE não mostrou alterações entre as linhagens celulares, e a análise de *Southern blotting* permitiu evidenciar uma banda de hibridização correspondente ao locus da *DHFR-TS* no cromossomo 6. Semelhante as linhagens celulares resistentes ao MTX derivadas da WT, a linhagem celular selecionada em 500 μ M de MTX derivada da linhagem deficiente de Rad9 mostrou um padrão de hibridização em arraste com a sonda da *DHFR-TS* (Figura 17A, direita). Este padrão de hibridização, como descrito anteriormente, é condizente com um alto número de cópias da *DHFR-TS* detectada por a PCR quantitativa e sugestiva da presença de elementos circulares extra cromossômicos na linhagem resistente ao MTX. Semelhante as linhagens celulares derivadas da linhagem WT que foram selecionadas ao MTX, o pré-tratamento com HU antes da seleção da WT, não levou a alterações detectadas no cariótipo por PFGE

Figura 17. Caracterização das amplificações que contém o locus da *DHFR-TS* nas células selecionadas no MTX mediante *souther blotting*. Os cromossomos das linhagens selecionadas em cada concentração foram separados mediante *pulse-field gel electrophoresis* (PFGE) e transferidas para a membrana de nylon para a hibridização com uma sonda contendo a sequência do gene da *DHFR-TS*. **A)** PFGE e *souther blotting* (esquerda) da linhagem WT, PFGE e *souther blotting* (no centro) da linhagem deficiente de Hus1 e PFGE e *souther blotting* (direita) da linhagem deficiente de Rad9 selecionadas no MTX. **B)** PFGE e *souther blotting* (esquerda) da linhagem WT, PFGE e *souther blotting* (no centro) da linhagem deficiente de Hus1 e PFGE e *souther blotting* (direita) da linhagem deficiente de Rad9 selecionadas no MTX previamente tratadas com 10mM de HU por 15h. NS: não selecionada. HU (-) : Sem pre-tratamento com Hidroxiureia; HU (+) : Pre-tratamento com Hidroxiureia.

em nenhuma etapa da seleção. A análise de *Southern blotting* mostrou, além da banda de hibridização do locus endógeno da *DHFR-TS*, uma banda de hibridização de intensidade semelhante à banda do locus endógeno com uma migração linear entre 680 e 745Kb na etapa de seleção de 50 μ M.

Na etapa de seleção de 500 μ M, esta mesma banda de migração linear foi detectada junto com um padrão de hibridização característico de migração de elementos circulares (Figura 17B, esquerda). Curiosamente, duas bandas de baixa intensidade com uma massa molecular de aproximadamente 680 e outra de 745kb foram observadas na etapa de seleção de 100 μ M. Estes resultados são condizentes com os resultados obtidos pela medição e quantificação do número de cópias da *DHFR-TS* sugerindo que o estresse de replicação com HU favorece a seleção de estruturas lineares em baixo número de cópias nas concentrações de seleção de 50 e 100 μ M do MTX, no entanto, na concentração de seleção de 500 μ M, o estresse de replicação favorece a seleção de estruturas circulares em alto número de cópias.

Por outro lado, as linhagens celulares derivadas da linhagem Hus1+/- resistentes ao MTX que foram tratadas com HU antes da seleção mostraram amplificação que foi detectada no cariótipo obtido por PFGE. Esta amplificação foi detectada a partir de etapas de seleção tão baixas como 20 μ M do MTX, com um padrão de migração linear de ~400Kb. Esta mesma amplificação foi detectada com um sinal de intensidade maior na etapa de seleção de 50 μ M e de 100 μ M, sugerindo estar presente num maior número de cópias nestas etapas de seleção. No entanto, na concentração de 500 μ M, a banda não foi detectada no cariótipo, como apresentado na figura 17B (no centro). Na análise de *Southern blotting* nós observamos não apenas a banda de hibridização no locus endógeno da *DHFR-TS* no cromossomo 6 em todas as etapas de seleção, mas também, uma banda de migração linear de baixa intensidade de hibridização de ~745kb contendo o gene da *DHFR-TS* na etapa de seleção de 10 μ M. Na etapa de seleção de 20 μ M, além de observar a mesma banda de ~745 kb de baixa intensidade, também observamos uma banda de intensidade comparável ao locus endógeno, de migração linear de ~400 Kb, contendo o locus da *DHFR-TS*, condizente com a banda da mesma massa molecular observada no cariótipo. Esta amplificação de ~400Kb também foi detectada pela sequência de *DHFR-TS* usada como sonda na etapa de seleção de 50 e 100 μ M. No entanto, na

etapa de seleção de 500 μ M, o padrão de hibridização observado foi característico das ampliações de natureza circular (Figura 17B, no centro).

O perfil de amplificação de estruturas lineares detectadas a partir das primeiras etapas da seleção nas linhagens deficientes da proteína Hus1 previamente tratadas com HU, foi confirmado em repetidas seleções como observado no apêndice B. Nesta nova replica experimental, a detecção do locus da *DHFR-TS* pela PCR quantitativa mostrou um incremento no número de cópias para este gene a partir da etapa de seleção de 20 μ M com ~11,0 *fold*, permanecendo constante em magnitude até a etapa de seleção de 100 μ M. Na etapa de seleção de 500 μ M, o número de cópias detectado foi ligeiramente superior (~13 *fold*) com respeito à etapa de seleção previa.

Por outro lado, uma estrutura de ~400 kb de migração linear foi observada nas mesmas etapas de seleção de 20 μ M, 50 μ M e 100 μ M junto com outra estrutura de ~945 kb também de migração linear na etapa de seleção de 50 μ M, com um sinal de baixa intensidade no gel corado com brometo de etídio. No entanto, na análise de *southern blotting*, nós observamos não só a banda de hibridização com a sonda de *DHFR-TS* no locus endógeno para este gene, mas também múltiplas bandas de hibridização nas etapas de seleção de 20 μ M, 50 μ M e 100 μ M correspondentes. Além disso, a banda de ~400kb foi detectada nas etapas de seleção de 50 μ M, e 100 μ M no *Southern blotting* como nós esperávamos, e duas bandas, uma de ~945 kb e outra de ~815kb foram observadas nesta replica experimental na etapa de seleção de 50 μ M. Na etapa de seleção de 500 μ M nós observamos também um padrão de hibridização característico das ampliações circulares (Apêndice B).

Para caracterizar melhor a amplificação de migração linear detectada nas linhagens celulares resistentes ao MTX derivadas da linhagem deficiente de Hus1 previamente tratada com HU observada na figura 17B (no centro), nós hibridizamos os cromossomos separados por PFGE com uma sonda contendo a sequência de repetição telomérica. Esta sonda detectou não só os cromossomos, mas também o elemento amplificado de ~400kb, demonstrando que esta amplificação é uma amplificação linear estabilizada com extremidades teloméricas (Figura 18). Este conjunto de análises da natureza das ampliações na linhagem Hus1+/- sugerem que a deficiência de Hus1 nas linhagens celulares sob estresse de replicação, favoreceu a amplificação de estruturas principalmente de natureza linear que foram detectadas desde as primeiras etapas da seleção, como foi evidenciado pelas

Figura 18. Confirmação da estrutura linear contendo o locus da *DHFR-TS* das linhagens celulares resistentes ao MTX derivadas da linhagem deficiente de Hus1 previamente tratada com HU antes da seleção. A confirmação da estrutura linear foi feita hibridizando a mesma membrana contendo os cromossomos transferidos da PFGE das linhagens resistentes ao MTX derivadas da linhagem deficiente de Hus1 previamente tratada com HU (figura 7B, no centro) com uma sonda específica de telomero. Cr: 6, cromossomo 6. A seta indica a amplificação linear detectada nas linhagens resistentes ao MTX.

estruturas lineares contendo o locus da *DHFR-TS* e a hibridização com sequências teloméricas, observadas no mínimo em duas replicas experimentais de seleção no MTX.

As linhagens celulares derivadas da linhagem Rad9+/- resistentes ao MTX previamente expostas a HU antes da seleção, não mostraram alterações detectadas no cariótipo molecular em nenhuma etapa da seleção. Na análise de *Southern blotting* nós observamos uma banda de hibridização correspondente ao locus endógeno da *DHFR-TS* em todas as etapas de seleção. Além disso, também observamos um padrão de hibridização em arraste desde etapas de seleção tão baixas como 50µM até etapas de 100µM e 500µM (Figura 17B, direita). Estes resultados condizentes com os resultados de PCR quantitativa, os quais mostraram um número alto de cópias da *DHFR-TS*, sugerem a presença de elementos circulares extracromossomais nestas etapas de seleção, favorecidos pela deficiência da proteína Rad9 após o estresse de replicação.

3.7. Caracterização da Natureza das Amplificações das Linhagens Selecionadas em MTX Previamente Expostas a CPT

Considerando que as linhagens celulares resistentes ao MTX derivadas da linhagem WT e da linhagem celular deficiente de Hus1 que foram pré-tratadas com CPT antes da seleção, apresentaram diferenças nos perfis de amplificação semelhantes ao pré-tratamento com HU, nós decidimos investigar também a natureza destas amplificações em PFGE e análise de *Southern blotting*.

As linhagens selecionadas em MTX derivadas da linhagem WT que foram pré-tratadas com CPT, não mostraram modificações no cariótipo. No entanto, a análise de *Southern blotting* mostrou, além da banda de hibridização do locus endógeno com a sequência da *DHFR-TS*, um padrão de hibridização em arraste na etapa de seleção de 500µM (Figura 19, esquerda), semelhante ao padrão encontrado na linhagem celular resistente a 500µM do MTX pré-tratada com HU. Estes resultados foram condizentes também com um alto número de cópias do gene da *DHFR-TS*, indicando a presença de elementos extracromossomais circulares.

Por outro lado, as linhagens selecionadas em MTX derivadas da linhagem celular deficiente de Hus1 que foram pré-tratadas com CPT, mostraram no cariótipo

uma banda de massa molecular ligeiramente menor (~375kb) do que a banda de ~400kb observada nesta mesma linhagem celular selecionada em MTX previamente tratada com HU. Esta banda de migração linear foi observada também em etapas de seleção tão baixas como 50µM do MTX, e continuou apresentando-se nas etapas de seleção de 100µM e 500µM (Figura 19, direita). Curiosamente, o padrão de hibridização nas células pré-tratadas com CPT na etapa de seleção de 500µM foi linear, diferente do padrão de hibridização em arraste observado após o pré-tratamento com HU para esta mesma concentração de seleção em MTX. Estes resultados são condizentes com os resultados da quantificação do número de cópias da *DHFR-TS* para estas linhagens WT e Hus1+/- resistentes ao MTX previamente expostas a CPT, e confirmam que, independente do estresse de replicação, a resposta a este evento tem um mecanismo comum que participa também na formação das amplificações contendo o gene da *DHFR-TS*, onde a natureza das amplificação seria estabelecida por os diferentes cenários proporcionados pelo comprometimento da integridade do complexo 9-1-1 ou de suas subunidades.

Em conjunto, estas observações sugerem que a deficiência das subunidades do complexo 9-1-1, tem um efeito na modulação da plasticidade genômica tanto na ausência como na presença de estresse de replicação em *Leishmania*. Na ausência de estresse de replicação por HU, a deficiência de Hus1 e Rad9 levou à inabilidade da célula para formar amplificações, observando-se um efeito mais severo na deficiência de Hus1 do que na deficiência de Rad9. Por outro lado, nas condições de estresse de replicação causado por HU (ou CTP como avaliado na linhagem Hus1+/-), a deficiência das proteínas Hus1 e Rad9 favoreceram a seleção de amplificações a partir de baixas concentrações de seleção no MTX. No entanto estas proteínas apresentaram duas funções separáveis que podem ser inferidas a partir do perfil e da natureza de amplificação. A deficiência de Hus1 levou a seleção de amplificações lineares em baixo número de cópias, enquanto que a deficiência da proteína Rad9 promoveu a seleção de elementos circulares em alto número de cópias. Estes fenótipos característicos poderiam ser explicados pela compartimentalização funcional das subunidades do complexo 9-1-1 reportada previamente por trabalhos realizados em nosso laboratório (Damasceno, Obonaga et al. 2016).

Figura 19. Caracterização das amplificações que contém o locus da *DHFR-TS* nas células selecionadas no MTX previamente tratadas com CPT mediante *Southern blotting*. Os cromossomos das linhagens selecionadas em cada concentração foram separados mediante *pulse-field gel electrophoresis* (PFGE) e transferidas para a membrana de nylon para a hibridização com uma sonda contendo a sequência do gene da *DHFR-TS*. PFGE e *Southern blotting* (esquerda) da linhagem WT, PFGE e *Southern blotting* (direita) da linhagem deficiente de Hus1 selecionadas no MTX previamente tratadas com 2 mM de CPT por 15 h. NS: não selecionada.

3.8. Análise do Efeito da Deficiência das Proteínas Hus1 e Rad9 na Síntese do DNA

Com o intuito de investigar o efeito da deficiência das proteínas Hus1 e Rad9 na síntese do DNA tanto na ausência como após a liberação de estresse de replicação, nós tratamos as células WT e linhagens deficientes de Hus1 e Rad9 com 10mM HU por 8h. Após esta incubação, nós cultivamos as células em meio livre de HU de onde foram coletadas após 4h, 8h e 12h da liberação da HU. A identificação das células na fase S foi feita mediante detecção do análogo IdU, metabolicamente incorporado pela exposição a um pulso de 30min com este composto antes de completar o tempo de cada coleta.

3.8.1. Análise de Perfil e de Progressão no Ciclo Celular das Células Incubadas com IdU Antes e Após do Bloqueio com 10 mM de HU por 8h.

A análise do perfil de progressão no ciclo celular da linhagem WT e linhagens deficientes de Hus1 e Rad9, foi obtido pela determinação do conteúdo do DNA das células incubadas com IdU e analisadas para a detecção da fase S de um experimento representativo.

Na análise do perfil e progressão no ciclo celular nós observamos que, na ausência de estresse de replicação e ao final do estresse de replicação, o perfil do ciclo celular foi semelhante entre as linhagens como apresentado na figura 20.

Após 4h da liberação da HU, nos observamos que os perfis de ciclo celular para a linhagem WT e a linhagem deficiente de Hus1 também foram semelhantes (Figura 20, acima e no centro). No entanto, a linhagem deficiente de Rad9 apresentou um atraso na progressão do ciclo celular indicado por um retorno menor das células para a fase G1 comparada com a WT (< 4% vs 7,42%) (Figura 20, embaixo).

Após 8h da liberação da HU, a linhagem deficiente de Hus1 progrediu mais rapidamente no ciclo celular comparada à linhagem selvagem. Este perfil de progressão foi demonstrado pela maior proporção de células na fase G1 que tinham retornado ao ciclo celular (33,6% vs 21,3%) e menor proporção de células nas fase S (21,6% vs 28,0%) e G2/M (40,7% vs 44,3%) comparado com a linhagem WT.

Figure 20. Efeito da deficiência das proteínas Hus1 ou Rad9 na progressão no ciclo celular antes e após a liberação do estresse de replicação. O gráfico apresenta os perfis de ciclo celular do experimento representativo da incorporação do IdU para a detecção da células na fase S mostrado na figura 21. As células foram bloqueadas com 10mM de HU por 8h e depois cultivadas em meio M199 1X livre de HU onde foram coletadas após 4h, 8h e 12h da liberação do bloqueio. Cada histograma representa ~20000 eventos analisados. n: Ploidia. IP: Iodeto de propideo. HU: Hidroxiureia.

Diferente do observado na deficiência de Hus1, a linhagem deficiente de Rad9 continuou mostrando um atraso na progressão do ciclo. Isto foi comprovado por uma porcentagem relativamente menor de células que tinham retornado à fase G1 (20,0% vs 21,3%), menor porcentagem de células na fase S (14,4% vs 28,0%) e maior porcentagem de células na fase G2/M (62,9% vs 44,3%) com relação à linhagem WT como apresentado na figura 20.

Após 12 h após a liberação da HU, a linhagem deficiente de Hus1 continuou progredindo mais rápido no ciclo celular comparada à linhagem WT, constatado pela maior porcentagem de células na fase G1 (35,0% vs 22,8%) e menor porcentagem de células na fase G2/M (36,2 % vs 46,6 %). Por outro lado, a linhagem deficiente de Rad9 continuou progredindo devagar no ciclo celular comparado com a linhagem WT, demonstrado pela menor porcentagem de células na fase S (17,5% vs 23,4%) e maior porcentagem na fase G2/M (55,7% vs 46,6%) comparada à linhagem WT (Figura 20).

Estes resultados são condizentes com os resultados previamente publicados (Damasceno, Obonaga et al. 2016) onde o perfil e a progressão do ciclo celular nestas linhagens foram avaliados após o bloqueio com uma concentração menor de HU e confirmam que a deficiência da proteína Hus1 estaria relacionada com a desregulação da progressão através do ciclo celular após o estresse de replicação, enquanto que a proteína Rad9 poderia ser requerida para promover a progressão no ciclo celular após a liberação do estresse de replicação, como demonstrado por uma progressão mais rápida da linhagem Hus1+/- e uma progressão mais lenta da linhagem Rad9+/- no ciclo celular após o estresse comparadas com a linhagem WT.

3.8.2. Análise Comparativa das Células na Fase S no Gráfico Bivariado da Incorporação do IdU e Conteúdo do DNA

Para a identificação das células em fase S no gráfico bivariado de conteúdo do DNA vs. a incorporação do IdU, nós estabelecemos um limiar de fluorescência usando um controle negativo composto por células incubadas com IdU e processadas somente com anticorpo secundário (alexa fluor 488) e em condições de desnaturação. A partir deste limiar construímos um *gate* que permitiu realizar as quantificações das células que incorporaram o IdU durante o tempo de exposição ao análogo de timidina

(ver materiais e métodos) nas células assíncronas não expostas à HU, ao fim do bloqueio e após a liberação em meio sem droga.

Os gráficos de densidade do conteúdo do DNA vs. a incorporação do IdU das células assíncronas foram comparáveis para as três linhagens. Nós encontramos que três populações distintas foram identificadas: células não marcadas em G1 com conteúdo do DNA $2n$, células não marcadas em G2/M com conteúdo do DNA $4n$ e células em fase S marcadas com o IdU e conteúdo do DNA entre $2n$ e $4n$. As células na fase S das três linhagens, apresentaram um conteúdo do DNA intermediário entre os dois extremos formando nos histogramas um arco acima das populações não marcadas. Estas células foram divididas em *early S*, *middle S* e *late S* para sua posterior análise como apresentado na figura 11. Por outro lado, apesar destas semelhanças no perfil de replicação do DNA, nós observamos que as células na fase S da linhagem Hus1 $\pm$ apresentaram valores de fluorescência maiores quando comparados com a linhagem WT.

Ao final do bloqueio com HU, nós observamos para as três linhagens nos gráficos de densidade, maior densidade de células paradas na fase G1 e menor porcentagem de células na fase S e G2/M, condizentes com os resultados da progressão das células no ciclo celular apresentados anteriormente. Após 4h da liberação do bloqueio, as células progrediram no ciclo celular observando-se um maior acúmulo na fase G2/M. As linhagens WT e Hus1 $\pm$ mostraram um retorno das células na fase G1, e a linhagem deficiente de Hus1, além de mostrar o retorno das células na fase G1, mostrou um maior densidade de células marcadas com IdU, referente as células em fase S (Figura 21).

As maiores diferenças na replicação do DNA, baseados na detecção imunocitoquímica do IdU apresentados no gráfico de densidade, foram observadas em 8h e 12h após liberação da HU. Assim, após 8h da liberação do bloqueio com HU, a linhagem Hus1 $\pm$ mostrou maior densidade de células no início e na metade da fase S quando comparada com a linhagem WT, enquanto que a linhagem Rad9 $\pm$ mostrou em geral menor densidade de células na fase S. Após 12h da liberação do bloqueio, a linhagem Hus1 $\pm$ continuou mostrando maior densidade de células na fase S, principalmente na metade e no final da fase S quando comparada à linhagem WT, enquanto que a linhagem Rad9 $\pm$ continuou apresentando menor densidade de células nesta fase comparada à linhagem WT, como mostrado na figura 21.

Figure 21. Distribuições bivariadas da incorporação do IdU e conteúdo do DNA da linhagem WT e linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 antes e após a liberação do estresse de replicação. As células foram bloqueadas com 10mM de HU por 8h e depois cultivadas em meio M199 1X livre de HU onde foram coletadas após 4h, 8h e 12h da liberação do bloqueio. 30min antes da coleta dos pontos indicados, as células foram pulsadas com 100μM do IdU para determinar as células na fase S. A detecção das células na fase S na ausência de estresse de replicação (células pré HU) foi feita mediante a exposição por 30min ao IdU antes da coleta. A identificação das células em fase S foi feita mediante a delimitação de um limiar de fluorescência fornecido por um controle negativo composto por células incubadas com IdU e processadas somente com anticorpo secundário. A partir de este limiar, construímos um *gate* que foi copiado para as amostras em todos os pontos avaliados. Baseados na incorporação do IdU e o conteúdo do DNA, identificamos as células nas fases G1, S e G2M. As células na fase S foram classificadas em *early S* (ES), *middle S* (MS) e *late S* (LS). n: Ploidia. IP: Iodeto de propideo.

3.8.3. Análise Comparativa da Porcentagem de Células na Fase S Entre a Linhagem WT e Linhagens Deficientes das Proteínas Hus1 ou Rad9

A partir das observações nos gráficos de densidade nós decidimos realizar uma análise comparativa da porcentagem de células na fase S da linhagem WT e linhagens deficientes de Hus1 e Rad9 antes do tratamento com HU (células assíncronicas) e após 8 e 12h da liberação da HU.

A análise da porcentagem das células na fase S mostrou que em média 39,9% ($\pm 0,73\%$) das células da linhagem WT; 42,4% ($\pm 1,78\%$) das células da linhagem Hus1+/- e 42,4% ($\pm 0,73\%$) das células da linhagem Rad9+/- sintetizaram DNA na ausência do estresse de replicação, como apresentado na figura 12. Após a análise estatística nós encontramos que a média da porcentagem de células Hus1+/- na fase S não foi diferente estatisticamente da média da porcentagem de células WT que estavam nesta mesma fase. Semelhante à linhagem deficiente de Hus1, a porcentagem de células na fase S da linhagem deficiente de Rad9 não foi diferente estatisticamente com relação à porcentagem das células na fase S da WT.

Apos 8h da liberação da HU nos encontramos que em média 28,7% ($\pm 3,0\%$) das células da linhagem WT, 30,5% ($\pm 1,8\%$) das células da linhagem Hus1+/- e 20,9% ($\pm 4,0\%$) das células da linhagem Rad9+/- foram identificadas na fase S, como observado na figura 22. As análises estatísticas mostraram que a média da porcentagem de células na fase S da linhagem deficiente de Hus1 foi ligeiramente maior comparada com a média da porcentagem de células nesta mesma fase da linhagem WT. No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Contrariamente a isto, a média da porcentagem de células na fase S foi maior na linhagem WT comparada com a linhagem Rad9+/-, mostrando ser diferente estatisticamente ($p < 0.05$) apenas após de 8h da liberação. Neste mesmo ponto de amostragem, a média da porcentagem das células na fase S da linhagem Rad9+/- foi também significativamente menor ($p < 0.05$) comparada com a média da porcentagem das células da linhagem deficiente de Hus1.

Apos 12h da liberação da HU nos encontramos que em média 28,3% ($\pm 4,3\%$) das células da linhagem WT, 31,0% ($\pm 1,7\%$) das células da linhagem Hus1+/- e 22,4% ($\pm 5,2\%$) das células da linhagem Rad9+/- foram identificadas na fase S, como observado na figura 22. As análises estatísticas mostraram que estas porcentagens

Figure 22. Análise da porcentagem de células WT e linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 na fase S. A análise foi feita a partir dos resultados das distribuições bivariadas da incorporação do IdU e conteúdo do DNA apresentado na figura 21. A média e o desvio padrão de três replicas biológicas são mostrados no gráfico. As diferenças entre os grupos foram avaliados mediante ANOVA e o teste de comparações multiples de turkey. Valor da significância estatística (valor p) 0.01 até 0.05 = *, 0.001 até 0.01 = **, 0.0001 até 0.001 = ***, <0.0001 = ****.

de células na fase S das linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 não foram significativamente diferentes da porcentagem das células nesta mesma fase da linhagem WT.

3.8.4. Análise Comparativa do Processo de Replicação a partir da Quantificação da Intensidade da Fluorescência das Células na Fase S que Incorporaram o IdU

Com intuito de explorar ainda mais o efeito da deficiência das proteínas Hus1 ou Rad9 no processo de replicação do DNA, nós quantificamos e analisamos a intensidade de fluorescência das linhagens deficientes de Hus1 e Rad9 que incorporaram o IdU no tempo de exposição a este composto, tanto na ausência de tratamento com HU quanto após a liberação da HU.

Nós observamos que, na ausência do tratamento, a mediana da intensidade fluorescência detectada nas células em fase S foi de 5957 unidades arbitrárias (u.a) (Intervalo intercuartil, IR 3102-10091 a.u) para a linhagem WT; 8623 u.a (IR, 3760-70409 a.u) para a linhagem deficiente de Hus1 e 6575 u.a (IR, 3603-54159 a.u) para a linhagem deficiente de Rad9 (Figura 23). As análises estatísticas mostraram que a intensidade de fluorescência das células na fase S das linhagens celulares deficientes de Hus1 ou Rad9 foram estatisticamente maiores do que a fluorescência das células na mesma fase da linhagem WT ($p < 0.0001$). Além disso, a diferença da fluorescência entre as linhagens deficientes foi também estatisticamente significativa ($p < 0.0001$).

Após 8 h da liberação da HU, a mediana da fluorescência detectada nas células na fase S foi de 4530 u.a (IR, 2434-8393 a.u) para a linhagem WT; 5751 u.a (IR, 2891-9702 a.u) para a linhagem deficiente de Hus1 e 3409 u.a (IR, 1923-8236 a.u) para a linhagem deficiente de Rad9, como observado na figura 23. As análises estatísticas mostraram que a diferença da fluorescência entre a linhagem WT e Hus1+/- foi também significativa ($p < 0.0001$), detectando-se uma maior fluorescência na linhagem Hus1+/- comparada à linhagem WT. Diferente da linhagem Hus1+/-, a fluorescência das células na fase S da linhagem Rad9+/- foi estatisticamente menor ($p < 0.0001$) em relação à linhagem WT.

Figura 23. Análise da fluorescência das células WT e linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 na fase S. A Análise foi feita a partir dos resultados das células na fase S das distribuições bivariadas da incorporação do IdU e conteúdo do DNA apresentado na figura 21 expressado em unidades arbitrárias (a.u). A mediana de três replicas biológicas é mostrada no gráfico. As diferenças entre as distribuições foram determinadas mediante o test de kruskal wallis. Valor da significância estatística (valor p) 0.01 até 0.05 = *, 0.001 até 0.01= **, 0.0001 até 0.001 = ***, <0.0001 = ****.

Após 12h da liberação do tratamento com HU, a mediana da fluorescência detectada na fase S da linhagem WT e as linhagens deficientes de Hus1 e Rad9 foi de 4623 u.a (IR, 2460-9322 a.u), 4944 u.a (IR, 2734-8364 a.u) e 4202 u.a (IR, 2140-10560 a.u) respectivamente, como apresentado na figura 23. As análises mostraram que a diferença das medianas da fluorescência entre Hus1 e a linhagem WT, não foi estatisticamente significativa. No entanto, a fluorescência das células na fase S da linhagem Rad9+/- foi estatisticamente menor do que a fluorescência das células WT ($p<0.001$). Adicionalmente, a fluorescência desta linhagem deficiente de Rad9 foi também, estatisticamente menor ($p<0.0001$) do que a linhagem deficiente de Hus1.

Em resumo, apesar de que as análises realizadas não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre as porcentagens de células na fase S das linhagens WT e deficiente de Hus1 que tenham sido detectadas antes do tratamento com a HU ou após a liberação da HU, a porcentagem de células na fase S sempre foi maior na linhagem Hus1 quando comparada à linhagem WT nas condições avaliadas. Condizente com estes resultados, nós observamos na análise da fase S no gráfico de densidade que, após 8h da liberação da HU, a linhagem Hus1+/- mostrou uma maior densidade de células localizada no início e na metade da fase S comparada com a linhagem WT, e após 12h da liberação da HU a maior densidade de células foi localizada na metade e ao final da fase S comparado com a linhagem WT. Por outro lado, a análise da incorporação do IdU por célula, como indicado pelo valor de intensidade da fluorescência, foi estatisticamente maior na linhagem deficiente de Hus1 com relação à linhagem WT antes do tratamento e após 8h da liberação da HU. Baseados neste conjunto de resultados, nós especulamos que a deficiência de Hus1 levaria a uma maior taxa de síntese do DNA nas células.

Contrariamente ao que foi observado na linhagem Hus1+/-, a linhagem deficiente de Rad9 apresentou uma porcentagem de células ligeiramente maior do que a linhagem WT na ausência de estresse de replicação. No entanto, a porcentagem de células na fase S da linhagem Rad9+/- detectado após a liberação da HU sempre foi menor do que a linhagem WT sendo estatisticamente significativa somente após 8h da liberação da HU. Concordante com estes resultados, observamos que a incorporação do IdU por célula também foi estatisticamente maior antes do tratamento com HU e estatisticamente menor após da liberação da HU comparado com a linhagem WT. Além disso, os resultados apresentados nos gráficos de densidade,

mostraram uma população de células na fase S mais heterogênea sem localizações específicas como foi observada na linhagem Hus1+/- após a liberação. Com base nestes resultados nós hipotetizamos que a linhagem deficiente de Rad9 apresenta também uma taxa de replicação aumentada em condições de ausência de estresse de replicação comparado com a linhagem WT. No entanto, este processo de replicação é contrariamente afetado após o estresse de replicação onde a proteína Rad9 seria necessária para a restauração da replicação do DNA e consequentemente a progressão no ciclo celular.

Estes resultados no seu conjunto reforçam a ideia de que o estresse de replicação estaria ativando uma resposta de sinalização ao dano no DNA onde as proteínas Hus1 e Rad9 poderiam atuar através de diferentes mecanismos em *Leishmania*.

3.8.5. Análise Comparativa das Células em *Early S*, *Middle S* e *Late S*

A replicação do DNA eucariótico é um processo organizado tanto temporal como espacialmente que começa a partir de múltiplas origens distribuídas por todo genoma e que são ativadas em diferentes momentos durante a fase S. Este programa espaço-temporal pode ser visualizado citogeneticamente nas células incubadas com análogos de timidina, como domínios ou focos em diferentes momentos durante esta fase. No mínimo três padrões que ocupam diferentes compartimentos no núcleo e que são diferentes uns de outros, são identificados e classificados como; *early S*, *middle S* e *late S*. Além das análises citogenéticas, as análises baseadas na detecção imunocitoquímica da incorporação dos análogos de timidina junto com o conteúdo do DNA e as análises destas distribuições bivariadas na citometria de fluxo, permitem a identificação e quantificação das células em *early S*, *middle S* e *late S*.

Com intuito de conhecer o efeito da deficiência das proteínas Hus1 ou Rad9 no processo de replicação do DNA, nós analisamos as porcentagens das células em *early S*, *middle S* e *late S* a partir do gráfico bivariado da incorporação do IdU vs. o conteúdo do DNA tanto na linhagem WT como nas linhagens deficientes de Hus1 e Rad9, antes do bloqueio e após 8h e 12h da liberação da HU.

As análises em ausência de estresse de replicação mostraram que, para a *early S* foram identificadas 21,7% ($\pm 4,2\%$) das células para a linhagem WT; 21,4% ($\pm 2,1\%$)

para a linhagem deficiente de Hus1 e 23,2% ($\pm 2,0\%$) para a linhagem deficiente de Rad9; em *middle S* foram identificadas 75,4 % ($\pm 6,9$) para a linhagem WT; 80,1% ($\pm 10,4\%$) para a linhagem deficiente de Hus1 e 79,1% ($\pm 6,5$) para a linhagem deficiente de Rad9; e em *late S* foram identificadas 47,9% ($\pm 2,1$ %) para a linhagem WT; 54,6% ($\pm 0,8\%$) para a linhagem Hus1 e 52,5% ($\pm 2,4\%$) para a linhagem Rad9, como apresentado na figura 24. As análises estatísticas comparando as porcentagens das respectivas fases entre as linhagens, não mostraram diferenças estatisticamente significativas com exceção das porcentagens em *late S* entre a linhagem WT e a linhagem Hus1+/-, onde este valor foi estatisticamente maior na linhagem deficiente de Hus1 ($p < 0.05$).

Após 8h da liberação da HU, nós encontramos que, em *early S* foram identificadas 19,4% ($\pm 3,4\%$) das células para a linhagem WT; 25,0% ($\pm 2,2\%$) para a linhagem deficiente de Hus1 e 16,9% ($\pm 4,9\%$) para a linhagem deficiente de Rad9. Em *middle S* foram identificadas 52,9% ($\pm 4,0\%$) para a linhagem WT; 72,6% ($\pm 6,4\%$) para a linhagem Hus1+/- e 33,7% ($\pm 5,1\%$) para a linhagem Rad9+/- . Em *late S* foram identificadas 23,4% ($\pm 4,5\%$) para a linhagem WT; 22,9% ($\pm 2,2\%$) para a linhagem Hus1+/- e 18,4% ($\pm 4,3\%$) para a linhagem Rad9+/-, como mostrado na figura 24. A análise estatística mostrou que, a porcentagem de células identificadas em *middle S* na linhagem Hus1+/- foi estatisticamente maior ($p > 0.05$) do que a porcentagem de células nesta mesma fase da linhagem WT, contrariamente ao observado para a linhagem deficiente de Rad9, onde a porcentagem de células em *middle S* foi estatisticamente menor ($p < 0.05$). Adicionalmente, a diferença nesta mesma fase foi estatisticamente significativa entre as linhagens deficientes ($p < 0.01$). Por outro lado, as porcentagens de células identificadas *early S* e em *late S* não foram diferentes estatisticamente entre as linhagens celulares.

Após 12h da liberação da HU, nós encontramos que, em *early S* foram identificadas 21,4% ($\pm 0,1\%$) das células para a linhagem WT; 19,8% ($\pm 2,5\%$) para a linhagem deficiente de Hus1 e 15,8% ($\pm 2,6\%$) para a linhagem deficiente de Rad9. Em *middle S* foram identificadas 49,4% ($\pm 2,6\%$) para a linhagem WT; 69,5% ($\pm 4,8\%$) para a linhagem Hus1+/- e 35,8% ($\pm 8,9\%$) para a linhagem Rad9 +/- . Em *late S* foram identificadas 24,9% ($\pm 5,3\%$) para a linhagem WT; 29,9% ($\pm 4,6\%$) para a linhagem Hus1+/- e 20,4% ($\pm 4,8\%$) para a linhagem Rad9+/-, como apresentado na figura 24.

Figura 24. Análise da porcentagem das células WT e linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 em *early S*, *middle S* e *late S* em relação à fase do ciclo celular antes e após a liberação do estresse de replicação. A análise foi feita a partir das distribuições bivariadas da incorporação do IdU e conteúdo do DNA apresentado na figura 21. A porcentagem relativa à fase foi calculado como a razão entre as células fluorescentes que incorporaram o IdU no total de células com o mesmo conteúdo do DNA expressadas como fração de 100. A média e o desvio padrão de três replicas biológicas são mostrados no gráfico. As diferenças entre os grupos foram estabelecidas mediante ANOVA e o teste de comparações multiples de turkey. Valor da significância estatística (valor p) 0.01 até 0.05 = *, 0.001 até 0.01 = **, 0.0001 até 0.001 = ***, <0.0001 = ****.

.A análise estatística mostrou que a porcentagem de células em *early S* da linhagem WT não mostrou diferença estatisticamente significativa com respeito a porcentagem de células nessa mesma fase da linhagem Hus1+/-, embora tenha sido estatisticamente maior ($p>0.05$) do que a porcentagem de células nessa mesma fase da linhagem Rad9+/- . Em *middle S*, a porcentagem de células da linhagem Hus1+/- foi estatisticamente maior ($p>0.05$) do que a porcentagem de células da linhagem WT e da linhagem Rad9 ($p>0.01$). No entanto, a porcentagem de células da linhagem WT não mostrou diferença significativa comparada com a porcentagem de células da linhagem Rad9+/- . Em relação a *late S*, a diferença entre as porcentagens identificadas na fase S tardia da linhagem WT e linhagens deficientes de Hus1 e Rad9, não foram estatisticamente significativas.

Estes resultados mostram que na ausência do estresse de replicação, a porcentagem de células que passa através da fase S foi semelhante para as três linhagens, onde foi observado uma porcentagem menor de células entrando na fase S, maior porcentagem de células em *middle S* e uma diminuição das células em *late S* (comparada com *middle S*, embora maior do que *early S*). Comparando as porcentagens das células em *middle S* relativa a fase das três linhagens após 8h (onde foram observadas as diferenças significativas entre as linhagem WT e linhagens deficientes) e após 12h da liberação (onde foi observada a diferença significativa entre a linhagem WT e a linhagem Hus1+/-), com as porcentagens de células em *middle S* das três linhagens avaliadas antes do tratamento com HU, nos observamos uma redução geral na porcentagem de células nessa fase para as três linhagens. Enquanto que a redução das células em *middle S* após 8h da liberação para Hus1+/- foi de 9,0% (80,1% vs 72,6%), nos encontramos reduções de 29,8% (75,4% vs 52,9%) e 57,4% (79,1% vs 33,7%) para a linhagem WT e a linhagem Rad9+/- respectivamente. Após 12h da liberação, nós observamos um perfil similar nestes valores em *middle S* para as três linhagens. Além disso, apesar de que nós não encontramos as diferenças significativas das porcentagens de células em *late S* entre as três linhagens 8h horas após a liberação, as três linhagens mostraram também uma redução maior de 50% quando comparada com as mesmas linhagens em *late S* antes do tratamento com HU [WT = 51,1 % (47,9 % vs 23,4 %); Hus1 = 58,1 % (54,6 % vs 22,9%); Rad9 = 65,0% (52,5 % vs 18,4 %)]. Da mesma forma, após 12 da liberação, o perfil de redução de células em *late S* foi similar ao perfil encontrado após 8h da liberação.

Estes resultados sugerem que o tratamento com HU afetou negativamente a taxa de replicação para as três linhagens conforme demonstrado pela diminuição da porcentagem de células na fase S total quando comparado com as mesmas células na fase S avaliadas na ausência de tratamento com HU. No entanto, este efeito foi consideravelmente maior para a linhagem WT e a linhagem deficiente de Rad9 em relação à linhagem Hus1+/-, onde a redução foi notavelmente menor. Isto é demonstrado pela redução da porcentagem de células em *middle S* (maior na linhagem Rad9+/- do que a linhagem WT) e a presença de células mortas por tratamento, com conteúdo de DNA entre 2n e 4n sem incorporação do IdU no gráfico densidade. Por outro lado, a redução da porcentagem de células em *late S* (com conteúdo de DNA 4n) poderia ser explicada por um maior número de células danificadas na fase G2/M e por um acúmulo de células que ainda não retornaram novamente no ciclo após a liberação do estresse de replicação. Uma vez mais, estes resultados demonstram que estas duas proteínas Hus1 e Rad9 podem atuar de forma independente e divergente em *Leishmania*.

3.9. Análise do Efeito da Deficiência das Proteínas Hus1 e Rad9 na Formação de Simples Fita do DNA

Com intuito de identificar se a deficiência das proteínas Hus1 ou Rad9 tem algum impacto no acúmulo de DNA de simples fita (*single strand DNA*, *ssDNA*), tanto na ausência de estresse de replicação como após a liberação do estresse, nós expusemos as células da linhagem WT e das linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 a estresse de replicação com 10mM de HU por 15h, previamente incubadas com IdU por 15h. Após este tempo, nós cultivamos as células em meio livre de HU onde foram coletadas após 6h, 12h, 18h e 36h da liberação da HU. A identificação das células com *ssDNA* foi feita pela detecção do IdU incorporado sem a desnaturação do DNA nas células incubadas com o IdU antes da exposição ao estresse de replicação, ao final do estresse de replicação e nos tempos descritos anteriormente após a liberação da HU, como descrito nos materiais e métodos.

3.9.1. Análise do Ciclo Celular e Progressão em Resposta ao Estresse de Replicação com 10mM de HU por 15h

Nós examinamos o perfil e a progressão no ciclo celular das células da linhagem WT e linhagens deficientes de Hus1 e Rad9 que foram usadas para a detecção de *ssDNA* através da determinação do conteúdo do DNA. Estas células foram incubadas com IdU por 15h antes do tratamento com 10mM HU e posteriormente liberadas do estresse de replicação até 36h.

Na análise do perfil e progressão no ciclo celular, nós observamos que, tanto na ausência de estresse de replicação, como ao final do tratamento com HU, o perfil do ciclo celular foi semelhante entre as linhagens, mostrando um padrão de distribuição assíncronico antes do estresse de replicação e uma parada permanente das células na fase G1 ao final do tratamento com HU (Figura 25).

No entanto, após 6h da liberação da HU, a linhagem deficiente de Hus1 progrediu mais rapidamente no ciclo celular comparado com a linhagem selvagem, condizente com o perfil de progressão observado após a liberação de HU na análise das células na fase S descrito anteriormente. Este perfil de progressão característico na linhagem Hus1+/- foi demonstrado por uma maior porcentagem de células que retornaram na fase G1 do ciclo celular (29,7% vs 27,3%) e uma menor proporção de células nas fase G2/M (43,6% vs 48,0%) comparado com a linhagem WT (Figura 25). No caso da linhagem deficiente de Rad9, nós observamos uma progressão mais devagar no ciclo celular comparado com a linhagem WT, demonstrado por uma menor proporção de células que haviam retornado na fase G1 (25,3% vs 27,3%) e uma maior proporção de células na fase G2/M (53,8% vs 48,0%) após a liberação da HU comparada a linhagem WT, como mostrado previamente.

Após 12h da liberação da HU, nós continuamos observando estas diferenças na progressão no ciclo celular. A linhagem deficiente de Hus1 mostrou porcentagem de células maior na fase G1 (33,0% vs 27,6%), maior na fase S (26,9% vs 23,3%) menor na G2/M (35,7% vs 42,2%), comparado com a linhagem WT, no entanto, a linhagem deficiente de Rad9 mostrou uma menor proporção de células que retornaram na fase G1 (26,0% vs 27,6%) do ciclo celular e uma maior proporção de células nas fase S (25,2% vs 23,3%) comparado com a linhagem WT (Figura 25).

Figura 25. Efeito da deficiência das proteínas Hus1 e Rad9 na geração de fita simples de DNA (ssDNA) antes e após a liberação do estresse de replicação. O grafico apresenta os perfis de ciclo celular do experimento representativo da detecção da células com ssDNA mostrado na figura 26. As células foram bloqueadas com 10mM de HU por 15h e depois cultivadas em meio M199 1X livre de HU onde foram coletadas após 6h, 12h, 18h e 36h da liberação do bloqueio. Cada histograma representa ~20000 eventos analisados. n: Ploidia. IP: Iodeto de propideo. HU: Hidroxiureia.

Após 18h da liberação da HU, as linhagens WT e Hus1+/- mostraram um perfil do ciclo celular semelhante, com uma diminuição no acúmulo de células na fase G2/M e retornando ao perfil de células assíncronas após 36h. No entanto, após 18h da liberação da HU, a linhagem deficiente de Rad9 continuou progredindo devagar quando comparada à linhagem WT, apresentando uma menor proporção de células que retornaram na fase G1 (29,1% vs 41,6%) e uma maior proporção de células na fase S (29,1% vs 20,0%) (Figura 25). Após 36h da liberação da HU, o perfil do ciclo celular da linhagem Rad9+/- não retornou completamente ao perfil assíncronico como foi observado para a linhagem WT, mostrando menor porcentagem de células que retornaram na fase G1 (32,0% vs 42,8%) e maior proporção de células nas fase S (27,0% vs 20,8%) e G2/M (33,6% vs 29,4%) (Figura 25).

3.9.2. Análise Comparativa das Células com ssDNA no Gráfico Bivariado do Conteúdo do DNA Versus Incorporação do IdU

Para a identificação das células com ssDNA no gráfico de conteúdo do DNA versus a incorporação do IdU, nós desenhamos um *gate* a partir de um limiar de fluorescência fornecido por um controle negativo composto por células incubadas no IdU e processadas somente com anticorpo secundário na ausência de desnaturação. Com este *gate* nós identificamos as células que incorporaram o IdU ou células com ssDNA, tanto antes do tratamento como após a liberação da HU (ver materiais e métodos).

Os gráficos de *dot plot* do conteúdo do DNA vs. a incorporação do IdU mostraram que, a linhagem WT e as linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 apresentaram células positivas para ssDNA de conteúdo variável na ausência de estresse de replicação, ao final do estresse de replicação e após o estresse de replicação. Além disso, nós observamos que em geral, a linhagem deficiente de Hus1 mostrou uma porcentagem menor de células com ssDNA quando comparada à linhagem WT, enquanto que a linhagem deficiente de Rad9 mostrou uma maior porcentagem de células com ssDNA comparada com a linhagem WT (Figura 26).

3.9.3. Análise Comparativa da Porcentagem de Células com ssDNA Total

A partir das observações nos gráficos de *dot plot* nós decidimos realizar uma análise comparativa da porcentagem de células com ssDNA antes do estresse de replicação, ao final do estresse e após da liberação da HU.

A análise mostrou que em média 13,6% ($\pm 2,1\%$) das células da linhagem WT; 2,9% ($\pm 1,9\%$) das células da linhagem Hus1+/- e 30,1% ($\pm 4,9\%$) das células da linhagem Rad9+/- apresentaram ssDNA na ausência do estresse de replicação, como apresentado na figura 27. Baseados na comparação das porcentagens de células com ssDNA identificadas anteriormente nós encontramos que, a linhagem deficiente de Hus1 apresentou 4,7 vezes menos células com ssDNA comparado com a linhagem WT (13,6% / 2,9%). No entanto, a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 2,2 vezes mais células com ssDNA comparada com a linhagem WT (30,1% / 13,6%).

Ao final do tratamento com HU nós encontramos que em média 40,8% ($\pm 4,7\%$) das células da linhagem WT; 20,8% ($\pm 11,4\%$) das células da linhagem Hus1+/- e 69,7% ($\pm 0,3\%$) das células da linhagem Rad9 +/- apresentaram ssDNA (Figura 27). Comparando as porcentagens de células com ssDNA identificadas, nós encontramos que, a linhagem deficiente de Hus1 apresentou 2,0 vezes menos células com ssDNA comparado com a linhagem WT (40,7% / 20,8%), enquanto que a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 1,7 vezes mais células com ssDNA comparada com a linhagem WT (69,7% / 40,7%).

Após 6h da liberação da HU nós encontramos que em média 39,7% ($\pm 4,7\%$) das células da linhagem WT; 15,0% ($\pm 12,1\%$) das células da linhagem Hus1+/- e 76,7% ($\pm 0,1\%$) das células da linhagem Rad9+/- apresentaram ssDNA, como mostrado na figura 17. A comparação das porcentagens de células com ssDNA identificadas mostrou que a linhagem deficiente de Hus1 apresentou 2,6 vezes menos células com ssDNA comparado com a linhagem WT (39,7% / 15,0%), enquanto que a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 1,9 vezes mais células com ssDNA comparada com a linhagem WT (76,6% / 39,7%).

Após 12h da liberação da HU nós encontramos que em média 25,3% ($\pm 10,0\%$) das células da linhagem WT; 21,7% ($\pm 19,1\%$) das células da linhagem Hus1+/- e 65,7% ($\pm 10,0\%$) das células da linhagem Rad9+/- apresentaram ssDNA (Figura 27). A análise comparativa entre as porcentagens de células com ssDNA mostrou que, a

Figura 26. Distribuição bivariada representativa da detecção de ssDNA e conteúdo do DNA da linhagem WT e linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9. As células foram incubadas com 100μM de IdU por 15h, lavadas para remover o IdU e depois tratadas com 10mM de HU por 15h. Após este tratamento, as células foram cultivadas em meio livre de droga e coletadas após 6h, 12h, 18 e 36h da liberação da HU. A identificação das células com ssDNA foi feito mediante um *gate* que foi desenhado a partir de um limiar basal de fluorescência fornecido por um controle negativo de células incubadas com o IdU mas que foram processadas na ausência de anticorpo primário (anti IdU), na qual acima deste limite, a células teriam DNA de fita simples. Baseados na detecção do IdU nativo e o conteúdo de DNA nós discriminamos as sub populações de células com ssDNA nas fases do ciclo celular, denotadas como fase G1_M, S_M, G2/M_M (M, marcado).

linhagem deficiente de Hus1 apresentou 1,2 vezes menos células com *ssDNA* comparado com a linhagem WT (25,3% / 21,3%), enquanto que a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 2,6 vezes mais células com *ssDNA* comparada com a linhagem WT (65,7% / 25,3%).

Após 18h da liberação da HU nós encontramos que em média 16,6% ($\pm 1,2\%$) das células da linhagem WT; 7,0% ($\pm 4,3\%$) das células da linhagem Hus1+/- e 46,7% ($\pm 5,0\%$) das células da linhagem Rad9+/- apresentaram *ssDNA* (Figura 27). A comparação entre as porcentagens de células com *ssDNA* mostrou que, a linhagem deficiente de Hus1 apresentou 2,3 vezes menos células com *ssDNA* comparado com a linhagem WT (16,6% / 7,0%), enquanto que a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 2,8 vezes mais células com *ssDNA* comparada com a linhagem WT (46,7% / 16,6%).

Finalmente, após 36 h da liberação da HU, nós curiosamente encontramos que em média 3,6% ($\pm 0,6\%$) das células da linhagem WT; 1,2% ($\pm 0,6\%$) das células da linhagem Hus1+/- e 21,0% ($\pm 6,5\%$) das células da linhagem Rad9+/- apresentaram *ssDNA*, valores que em geral, foram inferiores aos valores encontrados antes do início do tratamento (Figura 27). Por outro lado, a análise comparativa entre as porcentagens de células com *ssDNA* mostrou que, a linhagem deficiente de Hus1 apresentou 3,0 vezes menos células com *ssDNA* comparado com a linhagem WT (3,6% / 1,2%), enquanto que a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 5,8 vezes mais células com *ssDNA* comparada com a linhagem WT (21,0% / 3,6%).

Estes resultados mostram que, em geral a porcentagem de células com *ssDNA* na linhagem deficiente de Rad9 sempre foi maior (2,8 vezes em média) em todos os pontos avaliados (antes do estresse de replicação, ao final e após a liberação da HU) comparada com a linhagem WT. Contrariamente a este perfil, a linhagem deficiente de Hus1 mostrou uma porcentagem de células com *ssDNA* menor que a linhagem WT, (2,6 vezes em média) nos mesmos pontos avaliados, mostrando valores de até ~5,0 vezes menores na ausência de replicação comparado com a linhagem WT. As maiores porcentagens de células com *ssDNA* foram detectados ao final do estresse de replicação e após 6h da liberação da HU para a linhagem WT; e ao final do tratamento, 6h e até 12h após liberação da HU para as linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9.

Figura 27. Análise da porcentagem de células WT e linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 com *ssDNA* antes e após a liberação do estresse de replicação. A análise foi feita a partir da distribuição bivariada da detecção de *ssDNA* e o conteúdo do DNA apresentado na figura 26. O gráfico mostra a média e o desvio padrão de duas replicas biológicas.

Além disso, nós encontramos também que, inclusive 36h após a liberação da HU, onde as células com *ssDNA* deveriam estar próximas aos níveis basais, a linhagem Rad9 mostrou uma porcentagem considerável de células com *ssDNA* que foi ~6,0 vezes maior quando comparada com a linhagem WT. Estes resultados sugerem que, a deficiência de Rad9 levou a um incremento de *ssDNA* em condições de ausência de estresse de replicação nas células, o qual foi exacerbado em condições de estresse de replicação e após as primeiras horas da liberação da HU. Este *ssDNA* gerado por estresse de replicação foi mantido por mais tempo nestas células deficientes de Rad9 após a liberação do estresse de replicação. Por outro lado, a deficiência de Hus1 nas células, levou a uma diminuição de *ssDNA* mesmo nas condições da ausência de estresse de replicação. Ao final e após a liberação do estresse de replicação, o *ssDNA* aumentou nestas células deficientes por o efeito do próprio estresse. No entanto, a quantidade de células que mostraram *ssDNA* foi notavelmente inferior que as células que apresentam o complexo 9-1-1 intacto.

3.9.4. Análise Comparativa das Células com *ssDNA* na Fase G1, S e G2/M do Ciclo Celular

Nós analisamos a proporção das células positivas para *ssDNA* em cada uma das fases G1, S e G2/M (como descrito em materiais e métodos), tanto na linhagem WT como nas linhagens deficientes de Hus1 e Rad9 antes do tratamento, ao final do tratamento e após da liberação da HU.

Na ausência de estresse de replicação nós encontramos que na fase G1 5,2% ($\pm 0,6\%$) das células para a linhagem WT; 0,7% ($\pm 0,5\%$) das células para a linhagem deficiente de Hus1 e 14,0% ($\pm 3,7\%$) das células para a linhagem deficiente de Rad9 apresentaram *ssDNA*; na fase S foram identificadas 33,5% ($\pm 6,4\%$) para a linhagem WT; 9,3% ($\pm 6,0\%$) para a linhagem deficiente de Hus1 e 63,% ($\pm 4,7\%$) para a linhagem deficiente de Rad9; e na fase G2/M foram identificadas 15,0% ($\pm 2,6\%$) para a linhagem WT; 2,1% ($\pm 1,6\%$) para a linhagem Hus1+/- e 31,4% ($\pm 5,7\%$) para a linhagem Rad9+/-, como apresentado na figura 28. Na comparação da porcentagem de células com *ssDNA* nesta mesma condição, nós encontramos que, na fase G1, as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 7,4 (5,2% / 0,7%) vezes menos *ssDNA* do que a linhagem WT, no entanto, a linhagem deficiente de Rad9 apresentou

2,7 (14,0% / 5,2%) vezes mais *ssDNA* do que a linhagem WT. Na fase S as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 3,6 (33,5% / 9,3%) vezes menos *ssDNA* do que a linhagem WT e a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 1,9 (63,8% / 33,5%) vezes mais *ssDNA* do que a linhagem WT. Na fase G2/M as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 7,1 (15,0% / 2,1%) vezes menos *ssDNA* do que a linhagem WT enquanto que a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 2,1 (31,4% / 15,0%) vezes mais *ssDNA* do que a linhagem WT.

Ao final do estresse de replicação nós encontramos que na fase G1 37,0% ($\pm 3,9\%$) das células para a linhagem WT; 15,7% ($\pm 9,5\%$) das células para a linhagem deficiente de Hus1 e 66,5% ($\pm 0,5\%$) das células para a linhagem deficiente de Rad9 apresentaram *ssDNA*; na fase S foram identificadas 52,3% ($\pm 8,0\%$) para a linhagem WT; 34,1% ($\pm 15,4\%$) para a linhagem deficiente de Hus1 e 78,4% ($\pm 0,5\%$) para a linhagem deficiente de Rad9; e na fase G2/M foram identificadas 42,8% ($\pm 5,3\%$) para a linhagem WT; 30,2% ($\pm 12,3\%$) para a linhagem Hus1 e 69,6% ($\pm 0,3\%$) para a linhagem Rad9, como apresentado na figura 28. Na comparação da porcentagem de células com *ssDNA* nesta mesma condição, nós encontramos que, na fase G1, as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 2,4 (37,0% / 15,7%) vezes menos *ssDNA* do que a linhagem WT, no entanto, a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 1,8 (66,5% / 37,0%) vezes mais *ssDNA* do que a linhagem WT. Na fase S, as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 1,5 (52,3% / 34,1%) vezes menos *ssDNA* do que a linhagem WT enquanto que a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 1,5 (78,4% / 52,3%) vezes mais *ssDNA* do que a linhagem WT. Na fase G2/M, as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 1,4 (42,8% / 30,2%) vezes menos *ssDNA* do que a linhagem WT e a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 1,6 (69,6% / 42,8%) vezes mais *ssDNA* do que a linhagem WT.

Após 6h da liberação do estresse de replicação nós encontramos que na fase G1 10,3% ($\pm 2,0\%$) das células para a linhagem WT; 3,4% ($\pm 3,8\%$) das células para a linhagem deficiente de Hus1 e 54,0% ($\pm 4,3\%$) das células para a linhagem deficiente de Rad9 apresentaram *ssDNA*; na fase S foram identificadas 62,7% ($\pm 1,9\%$) para a linhagem WT; 31,8% ($\pm 21,1\%$) para a linhagem deficiente de Hus1 e 86,3% ($\pm 0,3\%$) para a linhagem deficiente de Rad9; e na fase G2/M foram identificadas 46,0% ($\pm 8,4\%$) para a linhagem WT; 15,2% ($\pm 13,9\%$) para a linhagem Hus1 e 80,4% ($\pm 1,1\%$) para a linhagem Rad9, como apresentado na figura 28.

Figura 28. Análise da porcentagem de células WT e linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 com *ssDNA* reativo à fase do ciclo celular antes e após o estresse e replicação. O gráfico foi feito a partir da distribuição bivariada da detecção de *ssDNA* e o conteúdo do DNA apresentado na figura 26. A porcentagem relativo à fase foi calculado como a razão entre as células fluorescentes com o IdU nativo em relação ao total de células com o mesmo conteúdo de DNA expressado como fração de 100. O gráfico representa a média e o desvio padrão de pelo menos duas replicas biológicas.

Na comparação da porcentagem de células com *ssDNA*, nós encontramos que, na fase G1, as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 3,0 (10,3% / 3,4%) vezes menos *ssDNA* do que a linhagem WT, enquanto que a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 5,2 (54,0% / 10,3%) vezes mais *ssDNA* do que a linhagem WT. Na fase S, as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 2,0 (62,7% / 31,8%) vezes menos *ssDNA* do que a linhagem WT, no entanto, a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 1,4 (86,3% / 62,7%) vezes mais *ssDNA* do que a linhagem WT. Na fase G2/M, as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 3,1 (46,0% / 15,2%) vezes menos *ssDNA* do que a linhagem WT e a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 1,7 (80,4% / 46,0%) vezes mais *ssDNA* do que a linhagem WT.

Após 12 h da liberação do estresse de replicação nós encontramos que na fase G1 6,5% ($\pm$ 4,4%) das células para a linhagem WT; 7,3% ($\pm$ 7,6%) para a linhagem deficiente de Hus1 e 36,5% ($\pm$ 9,4 %) para a linhagem deficiente de Rad9 apresentaram *ssDNA*; na fase S foram identificadas 35,1% ($\pm$ 12,4%) para a linhagem WT; 34,4% ($\pm$ 23,8%) para a linhagem deficiente de Hus1 e 76,6% ($\pm$ 7,8%) para a linhagem deficiente de Rad9; e na fase G2/M foram identificadas 33,8% ($\pm$ 12,9%) para a linhagem WT; 25,5% ($\pm$ 24,7%) para a linhagem Hus1 e 76,3% ($\pm$ 8,7%) para a linhagem Rad9, como apresentado na figura 28. Na comparação da porcentagem de células com *ssDNA*, nós encontramos que, na fase G1, as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 1,1 (7,3% / 6,5%) vezes mais *ssDNA* do que a linhagem WT e a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 5,6 (36,5% / 6,5%) vezes mais *ssDNA* do que a linhagem WT. Na fase S, as células da linhagem deficiente de Hus1 e a linhagem WT apresentaram porcentagens similares de *ssDNA*, no entanto a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 2,2 (76,6% / 35,1%) vezes mais *ssDNA* do que a linhagem WT. Na fase G2/M, as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 1,3 (33,8% / 25,5%) vezes menos *ssDNA* do que a linhagem WT, no entanto a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 2,3 (76,3% / 33,8%) vezes mais *ssDNA* do que a linhagem WT.

Após 18h da liberação do estresse de replicação nós encontramos que, na fase G1 4,9% ($\pm$ 0,9 %) das células para a linhagem WT; 1,6% ($\pm$ 1,1%) para a linhagem deficiente de Hus1 e 19,1% ($\pm$ 2,7%) para a linhagem deficiente de Rad9 apresentaram *ssDNA*; na fase S foram identificadas 26,2% ($\pm$ 1,3%) para a linhagem WT; 14,1% ($\pm$

7,9%) para a linhagem deficiente de Hus1 e 55,5% ($\pm 5,4\%$) para a linhagem deficiente de Rad9; e na fase G2/M foram identificadas 25,3% ($\pm 2,6\%$) para a linhagem WT; 8,5% ($\pm 5,3\%$) para a linhagem Hus1 e 58,8% ($\pm 3,9\%$) para a linhagem Rad9, como apresentado na figura 28. Na comparação da porcentagem de células com *ssDNA* nesta mesma condição, nós encontramos que, na fase G1, as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 3,1 (4,9% / 1,6%) vezes menos *ssDNA* do que a linhagem WT e a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 3,9 (19,1% / 4,9%) vezes mais *ssDNA* do que a linhagem WT. Na fase S, as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 1,9 (26,2% / 14,1%) vezes menos *ssDNA* do que a linhagem WT e a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 2,1 (55,5% / 26,2%) vezes mais *ssDNA* do que a linhagem WT. Na fase G2/M, as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 3,0 (25,3% / 8,5%) vezes menos *ssDNA* do que a linhagem WT e a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 2,3 (58,8% / 25,3%) vezes mais *ssDNA* do que a linhagem WT.

Após 36h da liberação do estresse de replicação nós encontramos que na fase G1 0,9% ($\pm 0,1\%$) das células para a linhagem WT; 0,3% ($\pm 0,2\%$) para a linhagem deficiente de Hus1 e 7,9% ($\pm 2,0\%$) para a linhagem deficiente de Rad9 apresentaram *ssDNA*; na fase S foram identificadas 5,8% ($\pm 0,7\%$) para a linhagem WT; 2,4% ($\pm 1,0\%$) para a linhagem deficiente de Hus1 e 26,6% ($\pm 6,8\%$) para a linhagem deficiente de Rad9; e na fase G2/M foram identificadas 7,1% ($\pm 0,9\%$) para a linhagem WT; 2,4% ($\pm 1,2\%$) para a linhagem Hus1+/- e 29,7% ($\pm 8,0\%$) para a linhagem Rad9+/- , como apresentado na figura 28. Na comparação da porcentagem de células com *ssDNA*, nós encontramos que, na fase G1, as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 3,0 (0,9% / 0,3%) vezes menos *ssDNA* do que a linhagem WT e a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 8,8 (7,9% / 0,9%) vezes mais *ssDNA* do que a linhagem WT. Na fase S, as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 2,4 (5,8% / 2,4%) vezes menos *ssDNA* do que a linhagem WT e a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 4,6 (26,6% / 5,8%) vezes mais *ssDNA* do que a linhagem WT. Na fase G2/M, as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 3,0 (7,1% / 2,4%) vezes menos *ssDNA* do que a linhagem WT e a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 4,2 (29,7% / 7,1%) vezes mais *ssDNA* do que a linhagem WT.

Estes resultados mostram que, as maiores porcentagens de células com *ssDNA* foram detectados na fase S e na fase G2/M em geral para as três linhagens

antes e após o estresse de replicação. Semelhante aos resultados encontrados em análises das porcentagens de células com *ssDNA* total, a linhagem celular deficiente de Rad9 mostrou maiores porcentagens de células com *ssDNA* do que a linhagem WT em todos os pontos avaliados. Contrariamente a isto, a linhagem celular deficiente de Hus1 mostrou porcentagens menores de células com *ssDNA* do a linhagem WT.

3.10. Análise da Deficiência das Proteínas Hus1 e Rad9 na Sinalização do Dano do DNA

A versão fosforilada da variante da histone H2AX, denotada como γ H2AX, é um dos marcadores mais importantes no início do dano no DNA nas células eucariotas. A indução da quebra de dupla fita no DNA nas células permite a fosforilação desta de histona na serina 139 na porção C terminal (em mamíferos) pelas quinases ATM, ATR ou proteína quinase dependente do DNA, promovendo uma cascata de sinalização do dano no DNA e a parada do ciclo celular. Nós tripanosomatídeos a histona H2A fosforilada (γ H2A) em seu resíduo de treonina na posição 130 na porção C terminal atua como marcador do dano resposta a lesões naturais no DNA, DSB induzidas por nucelases (por exemplo, *I-SceI*) ou por agentes químicos.

As análises multivariadas da detecção imunocitoquímica da γ H2A e as medidas do conteúdo do DNA permitem identificar não somente a presença do dano, mas também permitem correlacionar a possível presença de DSB nas células individuais com o ciclo celular. Assim, com o propósito de explorar ainda mais como a deficiência das proteínas Hus1 ou Rad9 afetam na sinalização do dano no DNA tanto na ausência de estresse de replicação como após a liberação do estresse, nós expusemos as células da linhagem WT e das linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 a estresse de replicação com 10mM de HU por 15h. Após este tempo de exposição nós cultivamos as células em meio livre de HU onde foram coletadas 6h, 12h, 18h e 36h após a liberação da HU. A identificação de células com dano no DNA foi feita pela detecção γ H2A antes da exposição ao estresse de replicação, ao final do estresse de replicação e nós tempos descritos anteriormente após a liberação da HU mediante citometria de fluxo.

3.10.1. Análise Comparativa das Células com Dano no DNA no Gráfico Bivariado do Conteúdo do DNA Versus γ H2A

A identificação das células com dano no DNA no gráfico de conteúdo do DNA versus γ H2A foi feita mediante o desenho de um *gate* a partir de um limiar de fluorescência proporcionado por um controle negativo composto por células sem tratamento com HU e processadas somente com anticorpo secundário. A partir deste *gate* nós identificamos as células com γ H2A ou células com dano no DNA, tanto antes do tratamento como após a liberação da HU.

Os gráficos de *dot plot* do conteúdo do DNA versus γ H2A mostraram que, na ausência de estresse de replicação, a linhagem WT e as linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 apresentaram uma porcentagem basal de células com γ H2A de conteúdo variável do DNA. Esta porcentagem de células marcadas com γ H2A aumentou como esperávamos ao final do tratamento com HU. No entanto, as maiores porcentagens de células com dano no DNA como determinado pela marcação da γ H2A, foi observado após 6 e 12h da liberação da replicação. Em 18h após a liberação, observamos uma diminuição da porcentagem de células com dano no DNA e em 36h após liberação da HU as porcentagens de células marcadas atingiram valores próximos os valores basais observados antes do tratamento. Por outro lado, comparando as porcentagens de células com dano no DNA, observamos que, a linhagem deficiente de Hus1 mostrou uma porcentagem menor de células com γ H2A comparada à linhagem WT, enquanto que a linhagem deficiente de Rad9 mostrou uma maior porcentagem de células com γ H2A comparada com a linhagem WT (Figura 29).

3.10.2. Análise Comparativa da Porcentagem de Células com γ H2A

A partir das observações nos gráficos de *dot plot* nós realizamos uma análise comparativa da porcentagem de células com γ H2A antes do estresse de replicação, ao final do estresse e após da liberação da HU. A análise mostrou que antes do estresse de replicação, em média 1,0% ($\pm 0,0\%$) das células da linhagem WT; 1,4% ($\pm 1,0\%$) das células da linhagem Hus1 +/- e 2,4% ($\pm 2,2\%$) das células da linhagem Rad9 +/- apresentaram γ H2A, como mostrado na figura 30. Comparando as porcentagens de células com γ H2A identificadas nós encontramos que, a linhagem.

Figura 29. Distribuição bivariada representativa da γ H2A e conteúdo do DNA da linhagem WT e linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 antes, ao final e após a liberação do estresse de replicação com HU. As células foram tratadas com 10mM de HU for 15h, lavadas ao final do tratamento e cultivadas em meio livre de HU, onde foram coletadas após 6h, 12h, 18h e 36h. A identificação das células com γ H2A foi feito mediante um *gate* que foi desenhado a partir de um limiar basal de fluorescência fornecido por um controle negativo de células que foram processadas na ausência de anticorpo primário (anti γ H2A), na qual acima deste limite, a células apresentariam dano no DNA. Baseados na detecção da γ H2A e o conteúdo de DNA nós discriminamos as sub populações de células com γ H2A nas fases do ciclo celular, denotadas como fase G1_M, S_M, G2/M_M (M, marcado). n: Ploidia. IP: Iodeto de propideo.

deficiente de Hus1 apresentou 1,4 (1,4% / 1,0%) vezes mais células com γ H2A comparado com a linhagem WT, e a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 2,4 (2,4% / 1,0%) vezes mais células com γ H2A comparada com a linhagem WT

Ao final do estresse de replicação, em média 11,3% ($\pm 7,4\%$) das células da linhagem WT; 1,9% ($\pm 1,2\%$) das células da linhagem Hus1+/- e 11,4% ($\pm 9,9\%$) das células da linhagem Rad9+/- apresentaram γ H2A (Figura 30). Baseados na comparação das porcentagens de células com γ H2A identificadas anteriormente nós encontramos que, a linhagem deficiente de Hus1 apresentou 5,9 (11,3 % / 1,9%) vezes menos células com γ H2A comparado com a linhagem WT, no entanto, a linhagem deficiente de Rad9 apresentou uma porcentagem de células com γ H2A semelhantes com a linhagem WT.

Após 6h do estresse de replicação, em média 31,7% ($\pm 2,7\%$) das células da linhagem WT; 14,4% ($\pm 3,5\%$) das células da linhagem Hus1+/- e 43,7% ($\pm 13,2\%$) das células da linhagem Rad9+/- apresentaram γ H2A, como mostrado na figura 30. Baseados na comparação das porcentagens de células com γ H2A identificadas anteriormente nós encontramos que, a linhagem deficiente de Hus1 apresentou 2,2 (31,7% / 14,4%) vezes menos células com γ H2A comparado com a linhagem WT, no entanto, a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 1,4 (43,7% / 31,7%) vezes mais células com γ H2A comparada com a linhagem WT.

Após 12h da liberação do estresse de replicação, em média 13,4% ($\pm 3,0\%$) das células da linhagem WT; 3,8% ($\pm 2,7\%$) das células da linhagem Hus1+/- e 19,7% ($\pm 4,4\%$) das células da linhagem Rad9+/- apresentaram γ H2A (Figura 30).

Comparando as porcentagens de células com γ H2A identificadas anteriormente nós encontramos que, a linhagem deficiente de Hus1 apresentou 3,5 (13,4% / 3,8%) vezes menos células com γ H2A em relação a linhagem WT. No entanto, a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 1,5 (19,7% / 13,4%) vezes mais células com γ H2A comparada com a linhagem WT.

Após 18 h da liberação do estresse de replicação, em média 7,2% ($\pm 1,3\%$) das células da linhagem WT; 4,8% ($\pm 3,1\%$) das células da linhagem Hus1+/- e 16,4% ($\pm 9,1\%$) das células da linhagem Rad9+/- apresentaram γ H2A (Figura 30). Comparando as porcentagens de células com γ H2A nós encontramos que, a linhagem deficiente de Hus1 apresentou 1,5 (7,2% / 4,8%) vezes menos células com γ H2A

Figura 30. Análise da porcentagem de células WT e linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 com γ H2A antes e após a liberação do estresse de replicação O gráfico foi feito a partir dos resultados da distribuição bivariada da γ H2A e conteúdo do DNA da linhagem WT e linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 apresentada na figura 29. O gráfico representa a média e o desvio padrão de pelo menos duas replicas biológicas.

comparado com a linhagem WT. No entanto, a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 2,3 (16,4% / 7,2%) vezes mais células com γ H2A comparada com a linhagem WT.

Após 36h da liberação do estresse de replicação, em média 1,7% ($\pm 0,1\%$) das células da linhagem WT; 1,7% ($\pm 1,8\%$) das células da linhagem Hus1 $\pm$ e 3,6% ($\pm 1,0\%$) das células da linhagem Rad9 $\pm$ apresentaram γ H2A (Figura 30). Comparando as porcentagens de células com γ H2A nós encontramos que, a linhagem deficiente de Hus1 apresentou uma porcentagem de células com γ H2A semelhante com a linhagem WT. No entanto, a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 2,1 (3,6% / 1,7%) vezes mais células com γ H2A comparada com a linhagem WT.

Condizentes com o observado no gráfico bivariado de γ H2A vs. o conteúdo de DNA, a linhagem deficiente de Rad9 mostrou em média, 1,7 vezes mais células com dano no DNA detectado pela marcação da γ H2A comparado com a linhagem WT antes, ao final e após a liberação do estresse de replicação. A linhagem deficiente de Hus1 mostrou em média, 2,6 vezes menos células marcadas com γ H2A em relação a linhagem WT nos mesmos pontos avaliados. Em condições de ausência de estresse de replicação, a linhagem Rad9 apresentou 2,4 vezes mais células com dano do que a linhagem WT. Essas análises junto com as análises da detecção de *ssDNA* e a progressão no ciclo celular sugerem que a deficiência de Rad9 leva a um aumento de *ssDNA* nas células o que torna as células sensíveis ao dano, como demonstrado pela maior detecção de γ H2A nas células deficientes de Rad9 em condições basais na ausência de estresse de replicação comparado com a linhagem WT. Após a exposição ao estresse de replicação, a proporção de células positivas para *ssDNA* aumentou consideravelmente pela predisposição causada pela deficiência da proteína Rad9 levando a maior dano no DNA detectado e, conseqüentemente, à progressão mais lenta no ciclo celular. Por outro lado, a deficiência da proteína Hus1, conforme os resultados obtidos, levou a uma diminuição na proporção de células positivas para *ssDNA* observada na ausência, ao final e após o estresse de replicação, que se viu refletida em menor dano no DNA e conseqüentemente, maior progressão no ciclo celular.

3.10.3. Análise Comparativa das Células positivas para γ H2A na Fase G1, S e G2/M do Ciclo Celular

As proporções das células positivas para γ H2A nas fases G1, S e G2/M em cada fase do ciclo celular foram analisadas, tanto na linhagem WT como nas linhagens deficientes de Hus1 e Rad9, antes, ao final e após da liberação do tratamento com HU.

Na ausência de estresse de replicação nós encontramos que na fase G1 0,7% ($\pm 0,1\%$) das células para a linhagem WT; 1,2% ($\pm 0,8\%$) das células para a linhagem deficiente de Hus1 e 2,2% ($\pm 2,4\%$) das células para a linhagem deficiente de Rad9 apresentaram γ H2A; na fase S foram identificadas 1,2% ($\pm 0,2\%$) para a linhagem WT; 2,1% ($\pm 1,0\%$) para a linhagem deficiente de Hus1 e 4,5% ($\pm 4,9\%$) para a linhagem deficiente de Rad9; e na fase G2/M foram identificadas 1,6% ($\pm 0,3\%$) para a linhagem WT; 1,4% ($\pm 1,4\%$) para a linhagem Hus1 e 2,4% ($\pm 1,3\%$) para a linhagem Rad9, como apresentado na figura 31. Na comparação da porcentagem de células com γ H2A na mesma fase, nós encontramos que, na fase G1, as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 1,7 (1,2% / 0,7%) vezes mais γ H2A do que a linhagem WT, no entanto, a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 3,1 (2,2% / 1,2%) vezes mais γ H2A do que a linhagem WT. Na fase S as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 1,9 (2,1% / 1,1%) vezes mais γ H2A do que a linhagem WT e a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 4,1 (4,5% / 1,1%) vezes mais γ H2A do que a linhagem WT. Na fase G2/M as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 1,1 (1,6% / 1,4%) vezes menos γ H2A do que a linhagem WT enquanto que a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 1,5 (2,4% / 1,6%) vezes mais γ H2A do que a linhagem WT.

Ao final do estresse de replicação nós encontramos que na fase G1 6,7% ($\pm 5,6\%$) das células para a linhagem WT; 1,6% ($\pm 1,4\%$) das células para a linhagem deficiente de Hus1 e 7,0% ($\pm 7,9\%$) das células para a linhagem deficiente de Rad9 apresentaram γ H2A; na fase S foram identificadas 16,0% ($\pm 7,6\%$) para a linhagem WT; 3,4% ($\pm 2,1\%$) para a linhagem deficiente de Hus1 e 20,2% ($\pm 15,7\%$) para a linhagem deficiente de Rad9; e na fase G2/M foram identificadas 23,5% ($\pm 12,3\%$) para a linhagem WT; 3,3% ($\pm 2,5\%$) para a linhagem Hus1 e 23,9% ($\pm 19,4\%$) para a linhagem Rad9, como apresentado na figura 31. Comparando a porcentagem de células com γ H2A na mesma fase, nós encontramos que, na fase G1, as células da

Figura 31. Análise da porcentagem de células WT e linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 com γ H2A reativo à fase do ciclo celular antes e após o estresse e replicação. O gráfico foi feito a partir dos resultados da distribuição bivariada da γ H2A e conteúdo do DNA da linhagem WT e linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9 apresentada na figura 29. A porcentagem relativo à fase foi calculado como a razão entre as células fluorescentes com γ H2A com relação ao total de células com o mesmo conteúdo do DNA expressado como fração de 100. O gráfico representa a média e o desvio padrão de duas replicas biológicas.

linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 4,2 (6,7% / 1,6%) vezes menos γ H2A do que a linhagem WT, no entanto, a linhagem deficiente de Rad9 apresentou porcentagens de células com γ H2A semelhantes à linhagem WT. Na fase S as células da linhagem Hus1+/- apresentaram 4,7 (16,0% / 3,4%) vezes menos γ H2A do que a linhagem WT e a linhagem Rad9+/- apresentou 1,3 (20,2% / 16,0%) vezes mais γ H2A do que a linhagem WT. Na fase G2/M as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 7,1 (23,5% / 3,3%) vezes menos γ H2A do que a linhagem WT enquanto que a linhagem deficiente de Rad9 apresentou uma porcentagem de células com γ H2A semelhante à linhagem WT.

Após 6h da liberação do estresse de replicação nós encontramos que na fase G1 8,2% ($\pm 1,7\%$) das células para a linhagem WT; 5,2% ($\pm 1,0\%$) das células para a linhagem deficiente de Hus1 e 16,4% ($\pm 12,4\%$) das células para a linhagem deficiente de Rad9 apresentaram γ H2A; na fase S foram identificadas 28,3% ($\pm 4,7\%$) para a linhagem WT; 8,5% ($\pm 0,5\%$) para a linhagem deficiente de Hus1 e 46,2% ($\pm 27,2\%$) para a linhagem deficiente de Rad9; e na fase G2/M foram identificadas 43,5% ($\pm 3,9\%$) para a linhagem WT; 19,7% ($\pm 4,8\%$) para a linhagem Hus1 e 52,2% ($\pm 33,0\%$) para a linhagem Rad9 (Figura 31). Comparando a porcentagem de células com γ H2A na mesma fase, nós encontramos que, na fase G1, as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 1,6 (8,2% / 5,2%) vezes menos γ H2A do que a linhagem WT, no entanto, a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 2,0 (16,4% / 8,2%) vezes mais γ H2A do que a linhagem WT. Na fase S as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 3,3 (28,3% / 8,5%) vezes menos γ H2A do que a linhagem WT e a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 1,6 (46,2% / 28,3%) vezes mais γ H2A do que a linhagem WT. Na fase G2/M as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 2,2 (43,5% / 19,7%) vezes menos γ H2A do que a linhagem WT enquanto que a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 1,2 (52,2% / 43,5%) vezes mais γ H2A do que a linhagem WT.

Após 12h da liberação do estresse de replicação nós encontramos que na fase G1 5,1 % ($\pm 1,7\%$) das células para a linhagem WT; 1,6% ($\pm 1,2\%$) das células para a linhagem deficiente de Hus1 e 8,7% ($\pm 2,7\%$) das células para a linhagem deficiente de Rad9 apresentaram γ H2A; na fase S foram identificadas 12,0% ($\pm 4,2\%$) para a linhagem WT; 3,0% ($\pm 2,1\%$) para a linhagem deficiente de Hus1 e 20,0% ($\pm 7,3\%$) para a linhagem deficiente de Rad9; e na fase G2/M foram identificadas 22,2% ($\pm 5,1\%$)

para a linhagem WT; 6,4% ($\pm 4,3\%$) para a linhagem Hus1 e 33,7% ($\pm 12,4\%$) para a linhagem Rad9 (Figura 31). Comparando a porcentagem de células com γ H2A na mesma fase, nós encontramos que, na fase G1, as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 3,2 (5,1% / 1,6%) vezes menos γ H2A do que a linhagem WT, no entanto, a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 1,7 (8,7% / 5,1%) vezes mais γ H2A do que a linhagem WT. Na fase S as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 4,0 (12,0% / 3,0%) vezes menos γ H2A do que a linhagem WT e a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 1,7 (20,0% / 12,0%) vezes mais γ H2A do que a linhagem WT. Na fase G2/M as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 3,4 (22,2% / 6,4%) vezes menos γ H2A do que a linhagem WT enquanto que a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 1,5 (33,7% / 22,2%) vezes mais γ H2A do que a linhagem WT.

Após 18 h da liberação do estresse de replicação nós encontramos que na fase G1 3,2% ($\pm 0,4\%$) das células para a linhagem WT; 2,5% ($\pm 1,7\%$) das células para a linhagem deficiente de Hus1 e 8,9% ($\pm 6,1\%$) das células para a linhagem deficiente de Rad9 apresentaram γ H2A; na fase S foram identificadas 6,1% ($\pm 0,2\%$) para a linhagem WT; 4,1% ($\pm 2,9\%$) para a linhagem deficiente de Hus1 e 15,0% ($\pm 8,7\%$) para a linhagem deficiente de Rad9; e na fase G2/M foram identificadas 14,0% ($\pm 2,1\%$) para a linhagem WT; 7,2% ($\pm 5,2\%$) para a linhagem Hus1 e 26,1% ($\pm 13,1\%$) para a linhagem Rad9 (Figura 31). Comparando a porcentagem de células com γ H2A na mesma fase, nós encontramos que, na fase G1, as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 1,3 (3,2% / 2,5%) vezes menos γ H2A do que a linhagem WT, no entanto, a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 2,8 (8,9% / 3,2%) vezes mais γ H2A do que a linhagem WT. Na fase S as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 1,5 (6,1% / 4,1%) vezes menos γ H2A do que a linhagem WT e a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 2,5 (15,0% / 6,1%) vezes mais γ H2A do que a linhagem WT. Na fase G2/M as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 1,9 (14,0% / 7,2%) vezes menos γ H2A do que a linhagem WT enquanto que a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 1,9 (26,1% / 14,0%) vezes mais γ H2A do que a linhagem WT.

Após 36h da liberação do estresse de replicação nós encontramos que na fase G1 0,8% ($\pm 0,0\%$) das células para a linhagem WT; 1,0% ($\pm 1,2\%$) das células para a linhagem deficiente de Hus1 e 1,4 % ($\pm 0,6\%$) das células para a linhagem deficiente

de Rad9 apresentaram γ H2A; na fase S foram identificadas 2,0% ($\pm 0,1\%$) para a linhagem WT; 2,1% ($\pm 2,4\%$) para a linhagem deficiente de Hus1 e 3,7% ($\pm 1,3\%$) para a linhagem deficiente de Rad9; e na fase G2/M foram identificadas 3,3% ($\pm 0,5\%$) para a linhagem WT; 2,8% ($\pm 3,1\%$) para a linhagem Hus1 e 7,5% ($\pm 2,4\%$) para a linhagem Rad9 (Figura 31). Comparando a porcentagem de células com γ H2A na mesma fase, nós encontramos que, na fase G1, as porcentagens de células com γ H2A da linhagem deficiente de Hus1 foram semelhantes à linhagem WT e a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 1,8 (1,4% / 0,8%) vezes mais γ H2A do que a linhagem WT. Na fase S as porcentagens de células com γ H2A da linhagem deficiente de Hus1 foram semelhantes à linhagem WT, no entanto a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 1,8 (3,7% / 2,0%) vezes mais γ H2A do que a linhagem WT. Na fase G2/M as células da linhagem deficiente de Hus1 apresentaram 1,2 (3,3% / 2,8%) vezes menos γ H2A do que a linhagem WT enquanto que a linhagem deficiente de Rad9 apresentou 2,3 (7,5% / 3,3%) vezes mais γ H2A do que a linhagem WT.

Estes resultados mostram que, em geral, as três linhagens apresentaram maior marcação de γ H2A na fase S e G2/M. A linhagem deficiente de Hus1 mostrou menor porcentagem de células com dano no DNA detectado por a marcação da γ H2A antes, ao final e após o estresse de replicação com HU enquanto que a linhagem deficiente de Rad9, mostrou maior dano no DNA nos mesmos pontos avaliados comparada com a linhagem WT.

3.11. Análise da Deficiência das Proteínas Hus1 ou Rad9 na Variação do Número dos Cromossomos

Para investigar o efeito da deficiência das proteínas Hus1 e Rad9 na variação do número de cromossomos, nós analisamos os dados de sequenciamento da linhagem WT e linhagens deficientes destas proteínas na ausência de tratamento, e comparamos as respectivas ploidias com a ploidia da linhagem de referencia, *L. major* friedlin. A análise mostrou que para a linhagem WT, os cromossomos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 32, 33, 34, 35 e 36 foram principalmente disômicos na população. No entanto, os cromossomos 1, 8, 11, 14, 20 e 23 foram principalmente trisômicos e o cromossomo 31 foi pentasômico (Figura 32). No caso da linhagem deficiente de Rad9, a análise mostrou que os cromossomos 2,

5 e 29 tiveram um incremento na ploidia, indicando que os cromossomos na população foram trissômicos e não disômicos como no caso da linhagem WT. Por outro lado, o cromossomo 31 mostrou uma diminuição na ploidia, indicando que a população foi predominantemente tetraploide e não pentaploide como mostrado para a WT (Figura 32). No caso da linhagem deficiente de Hus1, nós observamos uma redução na ploidia para os cromossomos 14 e 20 mostrando ser disômicos na população e não trissômicos como foi encontrado na linhagem WT (Figura 32).

Estes resultados mostram que a deficiência da proteína Rad9 levou predominantemente a um aumento na variação da ploidia comparado com a deficiência da proteína Hus1. O aumento na ploidia nestas células deficientes de Rad9 é condizente com a detecção do gene da *DHFR-TS* em alto número de cópias e a seleção de estruturas circulares contendo este locus após a pressão para seleção de resistência à MTX. Estes resultados sugerem que tanto a deficiência da proteína Hus1 como a deficiência da proteína Rad9 modulam a dosagem de genes e a ploidia em *L. major*.

Figura 32. Análise comparativo da variação do número de cromossomos nas linhagens deficientes de Hus1 ou Rad9. A *Read depth* foi escalada para dar um valor de dois para os cromossomos disômicos. A média do *read depth* de todos os cromossomos no genoma é indicado por as barras. As *reads* foram feitas a partir das células classificadas na fase G2/M de cada linhagem celular.

DISCUSSÃO

4. Discussão

A plasticidade do genoma de espécies de *Leishmania* é um aspecto marcante de sua biologia e possivelmente desempenha um papel importante nas interações estabelecidas por este protozoário nos diversos ambientes em que sobrevive. Nosso estudo demonstrou que as proteínas Hus1 e Rad9 podem desempenhar um importante papel na dosagem de genes em *L. major*. Esta afirmação baseia-se nas principais observações deste trabalho. Em primeiro lugar, a deficiência de Hus1 ou Rad9 favoreceu o aumento do número de cópias do gene *DHFR-TS* em células submetidas à seleção em MTX, principalmente após o estresse no processo de replicação do DNA. Em segundo lugar, a natureza das amplificações geradas nestes protocolos dependeu da deficiência da proteína envolvida. Em terceiro lugar, a deficiência de Hus1 e Rad9 levou a taxas alteradas e distintas de síntese de DNA. Em quarto lugar, a deficiência de Hus1 foi associada com níveis baixos de geração de *ssDNA* e menor dano no DNA enquanto que a deficiência de Rad9 foi associada como maior *ssDNA* e maior dano no DNA em resposta ao estresse de replicação. Em quinto lugar, o número de cópias de cromossomos foi alterado, o que parece depender da deficiência proteica envolvida. Em geral, nossos dados fornecem evidência da participação de Hus1 e Rad9 no balanço do número de cópias de genes em *L. major*.

Neste trabalho, usamos uma abordagem de seleção gradual no MTX com o objetivo de conhecer a participação das proteínas do complexo 9-1-1, Hus1 e Rad9 na modulação de dosagem de genes na *L. major*. Para isto nós selecionamos a linhagem WT e Hus1+/- ou Rad9+/- para a resistência ao MTX, um composto amplamente utilizado no estudo dos mecanismos moleculares da resistência à drogas em *Leishmania*. Esta droga atua como um potente inibidor da enzima diidrofolato redutase causando a depleção do tetraidrofolato, um cofactor enzimático que é requerido para a biossíntese do nucleotídeo timidina.

A análise da cinética de crescimento das linhagens resistentes ao MTX mostrou que, as linhagens WT, Hus1+/- e Rad9+/- apresentaram um atraso no crescimento quando comparadas às linhagens parentais WT, Hus1+/- e Rad9+/- não selecionadas, usadas como controle. Além disso, esta alteração foi diretamente relacionada com a concentração de MTX usada na seleção. No entanto, as linhagens resistentes ao MTX derivadas das linhagens Hus1+/- e Rad9+/- pre-tratadas com HU, mostraram uma alteração menor no tempo do crescimento, atingindo densidades celulares

semelhantes (como no caso das linhagens derivadas da Rad9+/-) ou maiores que as culturas controle não tratadas nem selecionadas (como no caso das linhagens derivadas da Hus1+/-). Contrariamente a isto, as linhagens resistentes ao MTX derivada da WT pre-tratada com HU mostraram um atraso maior no crescimento comparadas com a WT controle e com as linhagens resistentes ao MTX derivadas da linhagem sem pre-tratamento com HU.

As diferenças no crescimento observadas podem ser explicadas pela diferença no custo da homeostase, como frequentemente observado nas células que adquirem resistência (Natera, Machuca et al. 2007). As diferenças entre as células resistentes ao MTX derivadas das linhagens tratadas previamente com HU aparecem como consequência dos mecanismos de resistência, provavelmente diferentes favorecidos em um ou outro caso. No caso de outros organismos como os vírus, a resistência à drogas tem sido associada com a habilidade reduzida para replicar e causar doença (Geretti 2005). Nas bactérias, a resistência aos antibióticos é também associada com uma habilidade de competência reduzida contra as linhagens sensíveis aos antibióticos na ausência de estes (Lenski 1998, Gagneux, Long et al. 2006). Na *Leishmania* a homeostase definida por habilidades complexas que permitem ao parasita replicar satisfatoriamente e transmitir a doença o que é sinônimo de proficiência (Natera, Machuca et al. 2007). Em todos estes casos, a resistência à droga geralmente envolve um custo que pode afetar homeostase. O custo pago para atingir a resistência vai depender das mutações específicas conferidas (Natera, Machuca et al. 2007).

A seleção de *Leishmania* em MTX pode levar ao desenvolvimento de várias formas de resistência, tais como a redução na capacidade de internalização do medicamento, a alteração estrutural dos alvos da droga, e a amplificação de estruturas contendo os genes da DHFR e/ou PTR1 (Nare, Luba et al. 1997). Estes três mecanismos podem apresentar-se separadamente ou em combinação em várias linhagens resistentes ao MTX (Nare, Luba et al. 1997), demonstrado que são mecanismos independentes da resistência e, portanto, podem apresentar custos diferentes para a manutenção da homeostase celular.

Baseados no perfil de crescimento de nossas linhagens, nós podemos argumentar que o custo da homeostase, demonstrado pelo menor crescimento na presença do MTX, foi comparável nas células Hus1+/- e Rad9+/- quando comparadas

à linhagem WT, possivelmente pela seleção de um mesmo mecanismo de resistência, ou por um conjunto de mecanismos que resultaram em um mesmo fenótipo de crescimento. No entanto, as células resistentes ao MTX derivadas das linhagens Hus1+/- e Rad9+/- pre-tratadas com HU apresentaram outro cenário. A falta de uma sinalização eficiente mediada por estas subunidades do complexo 9-1-1, que atuam na via de ativação de ATR, combinada ao estresse causado por HU, levaria a um perfil de instabilidade genômica que permitiria uma maior reorganização genômica e possivelmente a seleção de linhagens com maior adaptabilidade à pressão da seleção em MTX. Isto levaria a um custo menor para atingir a resistência possivelmente causado por mutações compensatórias selecionadas nestas condições. Isto também é indicado pela ausência da reversão do custo da homeostase nas linhagens resistentes ao MTX derivadas da linhagem WT pre-tratada com HU. Isto sugere que o mecanismo de resistência selecionado nesta linhagem é provavelmente distinto ou pelo menos tem um componente diferente comparado com as linhagens deficientes.

Por outro lado, a quantificação do número de cópias e a identificação da natureza das amplificações contendo o gene da DHFR-TS das células selecionadas no MTX (pre-tratadas ou não com HU), mostraram dois possíveis cenários das funções das proteínas Hus1 e Rad9 na modulação da dosagem de genes na ausência de estresse e sob estresse de replicação na *Leishmania*.

Na ausência de estresse exógeno no processo de replicação do DNA, a deficiência das proteínas Hus1 e Rad9 levaram a um comprometimento na capacidade celular para gerar e selecionar eventos de amplificação, quando as linhagens deficientes são comparadas com a linhagem WT. Este efeito foi mais notável na deficiência de Hus1. Isto foi demonstrado pela detecção do número de cópias aumentado da *DHFR-TS* em concentrações de seleção de MTX muito maiores na linhagem deficiente. Curiosamente, a deficiência destas proteínas no contexto do estresse da replicação prévio pelo tratamento com HU, ou CTP no caso das células Hus1+/-, levou à seleção de eventos de amplificação com uma maior frequência quando comparadas as linhagens deficientes com a linhagem WT. Nas linhagens deficientes as amplificações foram detectadas em concentrações de seleção muito menores.

Além disso, o perfil de amplificação da *DHFR-TS* e a natureza das estruturas amplificadas contendo este gene indicam que as duas proteínas apresentam funções

diferentes neste processo. As amplificações detectadas nas células Hus1+/- na ausência de estresse de replicação foram exclusivamente lineares e somente detectadas na maior concentração de seleção. Em condições de estresse de replicação com HU o CPT, as amplificações foram também predominantemente lineares nestas células. Contrariamente a isto, as células Rad9+/- resistentes ao MTX mostraram amplificações circulares que foram selecionadas tanto na ausência como em condições de estresse da replicação com HU. Por outro lado, as células WT resistentes ao MTX mostraram amplificações circulares na ausência de estresse de replicação e a coexistência de elementos lineares e circulares na seleção em condições de estresse de replicação, onde os elementos circulares foram detectados nas concentrações maiores de seleção.

Baseados nestes resultados podemos considerar que a deficiência de Hus1 favoreceu a formação e/ou seleção de estruturas predominantemente lineares em baixo número de cópias. No entanto, os elementos circulares apresentam maior estabilidade que os elementos lineares possivelmente pela maior facilidade para o aumento do número de cópias em resposta à pressão aumentada da droga de seleção. Assim, estes elementos poderiam apresentar uma vantagem em conferir resistência (Grondin, Papadopoulou et al. 1993, Olmo, Arrebola et al. 1995, Grondin, Roy et al. 1996). Além disso, tem sido demonstrado que poucas células dentro da população carregam amplificações lineares e circulares, as quais são geradas espontaneamente durante a proliferação normal e a pressão exercida pelo tratamento permite não só selecionar estas células com um maior número de cópias (permitindo sua expansão clonal e predomínio na população), mas também incrementar o seu número de cópias dentro das células (Ubeda, Raymond et al. 2014, Kondratova, Watanabe et al. 2015). Desta forma consideramos que a formação de elementos circulares deva ser desfavorecida nas linhagens deficientes para Hus1. Não se pode descartar a possibilidade de formação destes elementos. Nos passos de seleção na concentração mais alta de MTX, detectamos elementos circulares nas linhagens pré-expostas à HU. Portanto, acreditamos que a deficiência de Hus1 deva comprometer a formação ou a seleção de amplificações circulares. Ainda é possível considerar que, pelos menos nas seleções em concentrações mais baixas, a geração e manutenção de elementos lineares devam ser favorecidos nas linhagens deficientes para Hus1.

Assim, é possível que a deficiência de Hus1 possa ter levado a um defeito no mecanismo de recombinação homóloga afetando a atividade e/ou o recrutamento da recombinase Rad51, além de seus parálogos, que sabidamente estão envolvidos na formação de amplificações circulares sem alterar a formação das amplificações lineares, conforme já observado em células de *L. infantum* onde Rad51 foi deletada (Ubeda, Raymond et al. 2014). Alternativamente, o favorecimento das estruturas lineares pode ser o resultado de translocações cromossômicas mediadas por microhomologia. Sabidamente, este fenômeno ocorre na ausência de um mecanismo de recombinação homóloga (Laffitte, Leprohon et al. 2016). Estas possibilidades precisam ser ainda melhor exploradas nas linhagens deficientes para as subunidades de 9-1-1. De qualquer forma, dois experimentos independentes de seleção em MTX das células Hus1+/- pre-tratadas HU e um experimento de seleção destas mesmas células pre-tratadas com CPT, mostraram uma amplificação linear de 400kb sugerindo que esta amplificação possivelmente foi formada no mesmo ponto de rearranjo a partir sequências repetitivas provavelmente próximas. Além disso, num dos experimentos das células pre-tratadas com HU nós observamos várias amplificações lineares, algumas delas de entre 800 e 1000 kb, além da amplificação de 400kb.

Por outro lado, no caso das células Rad9+/-, é difícil afirmar que a deficiência da Rad9 levou exclusivamente à formação de estruturas circulares. Mas está clara que houve, pelo menos, o favorecimento da seleção destes elementos circulares. O aumento abrupto no número de cópias circulares poderia mascarar a presença de células com elementos lineares em baixo número de cópias, que escapariam à detecção nos testes realizados. De qualquer forma, a deficiência de Rad9 em condições de estresse de replicação permitiu uma maior frequência de amplificações circulares em um número muito alto quando comparada com a WT.

Relatos prévios na literatura sugerem que tanto Hus1 como Rad9 podem ter uma função no reparo de DSB mediada por recombinação homóloga. Este fato é apoiado pela observação da redução deste evento na ausência destas proteínas (Pandita, Sharma et al. 2006, Wang, Hu et al. 2006) e também pela interação física *in vitro* da Rad9 com a principal recombinase nos eucariotos, a proteína Rad51 (Pandita, Sharma et al. 2006). Adicionalmente a isto, mostrou-se recentemente que em *Saccharomyces cerevisiae* e em células de mamífero (U2OS), as proteínas do complexo 9-1-1 tem uma função central na coordenação da ressecção do DNA

(Blaikley, Tinline-Purvis et al. 2014, Ngo, Balakrishnan et al. 2014, Tsai and Kai 2014, Ngo and Lydall 2015). A ressecção do DNA é a primeira etapa no reparo de DSB por recombinação homóloga e é necessária para gerar as extremidades de ssDNA que mediarão a recombinação. Considerando que a amplificação gênica é promovida principalmente por recombinação homóloga em *Leishmania* (Laffitte, Genois et al. 2014, Ubeda, Raymond et al. 2014, Laffitte, Leprohon et al. 2016) o incremento do número de cópias da *DHFR-TS* promovido pela deficiência, principalmente de Rad9 em condições de estresse de replicação, é uma indicação indireta de que as proteínas Hus1 e Rad9 possam influenciar a atividade das proteínas que tem uma função no reparo por recombinação homóloga e, conseqüentemente, ter um impacto na plasticidade genômica de *Leishmania*.

A análise do efeito da deficiência das proteínas Hus1 ou Rad9 na síntese de DNA mostrou fenótipos distintos e opostos nas células Hus1+/- e Rad9+/-, especialmente após a liberação do tratamento com HU. A porcentagem de células na fase S sempre foi maior na linhagem Hus1+/- quando comparada à linhagem WT antes e após a liberação do estresse de replicação. No entanto, a porcentagem de células na fase S da linhagem Rad9+/- foi maior antes do tratamento com HU e menor após a liberação da HU comparada com a WT, sendo estatisticamente significativa somente após 8h da liberação. Além disso, apesar de que a taxa de replicação das três linhagens tenha sido afetada pelo tratamento, como demonstrado por uma diminuição da porcentagem total de células na fase S após a liberação da HU, as células Hus1+/- mostraram uma maior taxa de replicação. Condizentes com estes resultados, a análise da incorporação do IdU por célula, como indicado pelo valor de intensidade média da fluorescência, foi maior na linhagem deficiente de Hus1 quando comparada com a linhagem WT antes e após a liberação do tratamento por HU. Por outro lado, o valor da fluorescência média das células da linhagem Rad9+/- foi estatisticamente maior antes do tratamento com HU e menor após a liberação da HU quando comparada à linhagem WT. Além disso, a progressão no ciclo celular mostrou que após o estresse de replicação com HU, a linhagem Hus1+/- progrediu, mas rápido enquanto que a linhagem Rad9+/- progrediu, mais lentamente. Por outro lado, a análise da porcentagem de células em *early*, *middle* e *late* S mostrou que a porcentagem de células em *middle* S de Hus1+/- sempre foi maior estatisticamente

que a porcentagem de células em *middle S* das linhagens WT e Rad9+/- após a liberação da HU, enquanto que a linhagem Rad9+/- mostrou um efeito oposto.

Se tem relatado na literatura que as células deficientes de vários checkpoints ou proteínas do reparo do DNA, apresentam uma velocidade reduzida de replicação e um incremento na densidade dos eventos do início de replicação na ausência de estresse de replicação exógenos, o que poderia ser o resultado do mesmo estresse de replicação ou uma resposta de compensação para manter a taxa de replicação constante devido a progressão diminuída da forquilha (Techer, Koundrioukoff et al. 2017). Baseados nisto, nós podemos propor por que as células Hus1+/- e Rad9+/- apresentam uma taxa incrementada de síntese na ausência de estresse de replicação comparada com a linhagem WT.

Em relação ao efeito da deficiência de Hus1 na síntese do DNA, um estudo prévio em células de mamífero mostrou que Hus1 não somente interage com PCNA (Komatsu, Wharton et al. 2000, Wang, Guan et al. 2004), mas tem uma função na liberação deste homotrímero da cromatina após o dano no DNA (Wang, Guan et al. 2004). Em resposta ao dano no DNA, as células em proliferação diminuem normalmente a progressão através da fase S pela ativação do checkpoint mostrando uma inibição transiente da replicação do DNA. Esta inibição da replicação do DNA induzida pelo dano, afeta tanto o início da replicação como a cadeia de alongação. As células de mamífero deficientes de Hus1, após tratamento com CPT ou radiação ionizante (*ionising radiation, IR*), mostraram uma inibição do início da replicação e maior progressão no ciclo celular quando comparadas com as células WT. Além disso, estas mesmas células deficientes de Hus1, após a exposição a altas doses de CPT ou IR, não mostram alteração nos foci de PCNA, enquanto as células WT apresentaram foci reduzidos. Isto demonstrou que Hus1 interfere na função de replicação do PCNA nas células de mamífero após o tratamento com CPT ou IR.

Baseados nestas informações nós podemos especular que a proteína Hus1 de *Leishmania* poderia ter um efeito similar na regulação do replissoma de forma direta ou indireta, demonstrado pela capacidade das células Hus1+/- em retomar a replicação seguido do estresse com HU em um tempo menor comparado com a linhagem WT. Isto também é apoiado por a maior progressão no ciclo celular que apresentam estas células após a liberação da HU.

A deficiência de Hus1 levou a um aumento na porcentagem de células em *middle S* após o tratamento com HU. Baseados em nossos experimentos não podemos assegurar que Hus1 tenha uma função na regulação das origens de replicação, mas é uma possibilidade que precisa ser avaliada. Esta hipótese é baseada no papel de 9-1-1 na ativação da ATR quinase. Um dos substratos mais importantes desta quinase é a quinase Chk1. Estas duas quinases, ATR e Chk1, regulam negativamente as origens de replicação prevenindo o excessivo disparo de replicação em células não estressadas. Isto é evidenciado por estudos que mostram que a perda da atividade ATR em *Xenopus laevis* permite um excessivo disparo das origens particularmente em early S (Marheineke and Hyrien 2004, Shechter, Costanzo et al. 2004). Por outro lado, a perda da atividade de Chk1 nas células de mamíferos, resulta no disparo das origens de late S ainda em early S (Katsuno, Suzuki et al. 2009).

No caso das células Rad9+/-, nós poderíamos especular que possivelmente a deficiência da Rad9 em condições de estresse de replicação com HU, levou a uma maior porcentagem de células com forquilhas paradas ou em colapso que não conseguiram restaurar a replicação. Possivelmente o estresse de replicação levou a alterações na estrutura da forquilha que foram irreversíveis em uma porcentagem considerável. Isto é apoiado pelo maior tempo das células deficientes de Rad9 para restaurar a replicação do DNA, pela progressão mais lenta através do ciclo celular, pela menor taxa de replicação das células após a liberação e pela maior quantidade de células mortas como observado no gráfico de densidade quando comparadas com a linhagem WT.

No entanto, independente do mecanismo responsável por estes fenótipos, podemos sugerir que a proteína Rad9 é necessária para reiniciar eficientemente a replicação do DNA, para promover a progressão através do ciclo e para reparar o DNA seguido do estresse de replicação. Por outro lado, a proteína Hus1 estaria relacionada com a desregulação da síntese do DNA e progressão através do ciclo celular após o estresse de replicação.

As análises de detecção de ssDNA e γ H2A como indicadores de estresse de replicação e dano no DNA mostraram que a linhagem Rad9+/- apresentou uma maior porcentagem de células com ssDNA na ausência do estresse de replicação. Por outro lado, a linhagem Hus1+/- mostrou uma porcentagem de células com ssDNA menor que a linhagem WT nos mesmos pontos avaliados. Estes resultados são condizentes

com o nível de dano observado nestas células, onde a linhagem Rad9+/- mostrou maior porcentagem de células com dano no DNA, enquanto a linhagem Hus1+/- mostrou menor porcentagem de células com dano comparadas com a linhagem WT. No caso da linhagem Rad9+/-, a presença de altos níveis de ssDNA e dano no DNA detectados na ausência do tratamento com HU poderia indicar que a deficiência de Rad9 leva à incapacidade da célula de responder eficientemente o estresse de replicação, incluindo o estresse endógeno. Dentro dos principais contribuintes ao estresse de replicação endógeno estão a sequências repetitivas no genoma (Liu, Carvalho et al. 2012) e o processo de transcrição de genes. Em relação as sequências repetitivas no genoma, estas estão envolvidas na parada da forquilha de replicação por impedimento de sua progressão e consequente favorecimento de rearranjos na molécula de DNA. Por outro lado, o processão da transcrição pode levar ao estresse de replicação quando as maquinarias de transcrição e replicação viajam ao longo da mesma sequência ao mesmo tempo (Garcia-Muse and Aguilera 2016). No caso de *Leishmania*, é conhecido que seu genoma apresenta um número elevado de sequências repetitivas distribuídas nos cromossomos, o que poderia contribuir a estresse de replicação (Ubeda, Raymond et al. 2014).

O contexto de altos níveis de ssDNA e yH2A encontrados nas células Rad9+/- tratadas com HU, assemelha-se, em certo grau, ao efeito observado nas células com inibição da ATR em condições de estresse de replicação causado pela HU (Toledo, Altmeyer et al. 2013). Como vimos anteriormente, a ótima ativação da quinase ATR requer da interação da TopBp1 com a cauda C terminal da Rad9 (Delacroix, Wagner et al. 2007, Lee, Kumagai et al. 2007). Uma destas funções é estabilizar a forquilha de replicação indiretamente, suprimindo o disparo das origens tardios o que previne a depleção da proteína RPA. Existem relatos de que, em condições de inibição da ATR combinada com a inibição da HU, a proteína RPA é esgotada na célula. Este fenômeno é explicado pelo disparo excessivo das origens e pelo acúmulo de ssDNA nas forquilhas de replicação, pelo desacoplamento da polimerase da helicase e pelo colapso das forquilhas (Toledo, Altmeyer et al. 2013). As forquilhas em colapso não reparadas ao final deste processo de esgotamento dos fatores da replicação, poderia explicar por que as células Rad9+/- continuam apresentando dano no DNA após 36h da liberação do tratamento com HU. Por outro lado um fenótipo observado também nas células deficientes em checkpoint expostas a HU é o aumento na reversão da

forquilha de replicação e a ressecção da nova fita sintetizada. Nos mamíferos, a enzima SMARCAL1, principal enzima de reversão da forquilha, é regulada pela ATR quinase. A perda da regulação por ATR leva a uma reversão da forquilha excessiva e, conseqüentemente, a DSB (Couch, Bansbach et al. 2013). Além disso, as células de levedura deficientes de checkpoint como perda da atividade de Rad53 (Chk2 em mamíferos) mostram uma atividade elevada de certas nucleases como a nuclease Exo1. Esta nuclease gera intermediários de ssDNA nas forquilhas revertidas o que também leva ao colapso (Cotta-Ramusino, Fachinetti et al. 2005).

No caso da linhagem Hus1, o efeito da deficiência de Hus1 na geração de ssDNA e, conseqüentemente, de dano ao DNA foi menos severo comparado com a deficiência de Rad9, tanto na ausência de estresse de replicação exógeno como após a liberação do tratamento com HU. Isto foi aparente na capacidade destas células em reiniciar a replicação mais rapidamente quando comparadas à linhagem WT. É possível que este fenótipo esteja relacionado com a incapacidade destas células deficientes de Hus1 em liberar o complexo PCNA da cromatina após o dano no DNA como discutido anteriormente. O efeito poderia ser ainda conferir um efeito “protetor” num curto prazo. No entanto, como comentamos anteriormente, outros mecanismos podem estar envolvidos nestes fenótipos celulares.

Finalmente, as análises de variação do número de cópias dos cromossomos nas células Hus1+/- e Rad9+/- mostraram que a deficiência da proteína Rad9 teve também um impacto na ploidia da célula que pareceu aumentada quando comparada com a deficiência de Hus1. Não sabemos se a variação observada nestas células seria ainda maior, devido ao efeito cumulativo da análise de sequenciamento global, mas a variação encontrada na deficiência destas proteínas nos permite sugerir que estas proteínas podem ter não só uma função de modulação na dosagem de genes, mas também no controle da ploidia em *Leishmania*.

À guisa de conclusão, este trabalho contribuiu na caracterização em *Leishmania* de proteínas que desempenham papéis centrais na homeostase genômica de outros eucariotos. Mostramos que as subunidades do complexo 9-1-1, Hus1 e Rad9, participam na sinalização de situações de estresse no processo de replicação do DNA. Além disso, apresentamos evidências de que a proteína Hus1 pode promover ou controlar a variação do número de cópias de genes, bem como a natureza e arquitetura de elementos gerados por amplificação gênica, dependendo do

grau de estresse a que a célula do parasito está exposto. As proteínas Hus1 e Rad9 parecem também estar envolvidas na modulação da taxa de síntese de DNA. A estudo de fatores envolvidos nestes eventos é de extrema importância quando consideramos os diferentes ambientes aos quais o parasito está exposto durante seu ciclo de vida. Assim, acreditamos ter contribuído para o entendimento da biologia de um organismo de importância médica indiscutível.

Apêndice A. Aneuploidia em diferentes espécies de *Leishmania*. O número de cada cromossomo determinado por a análise de *read depth* das sequencias genômicas são representados por diferentes cores (azul, verde e amarelo). As cores intermedias representam valores de *read depth*, os quais provavelmente são causados por a mistura de populações de células com mosaismo cromossômico. Os dados da somia das primeiras 8 linhagens são tomadas de Rogers et al, e o número de cópias dos cromossomos das 17 linhagens restantes são tomadas de Downing et al. As caixas com X indicam os cromossomos que não existem como resultado da fusão entre o cromossomo 20 e 34 em *L. braziliensis* e entre o cromossomo 8 e 29 e o cromossomo 20 e 36 em *L. mexicana*. Abreviações *L. bra*, *L. braziliensis*; *L. mex* *L. mexicana*; *L. maj*, *L. major*; *L. inf*, *L. infantum*; *L. don*, *L. donovani*. Esta figura foi modificada a partir da figura publicada (Mannaert, Downing et al. 2012).

Apêndice B. Análise de PCR quantitativo para a detecção da variação do número de cópias do gene da *DHFR-TS* e caracterização das amplificações nas linhagens selecionadas no MTX derivadas da linhagem *Hus1*^{+/-}. A) Variação do número de cópias da *DHFR-TS* detectado nas linhagens resistentes ao MTX derivadas da linhagem deficiente de *Hus1* previamente tratada com 10mM de HU por 15h antes da seleção. B) PFGE (esquerda) e *southern blotting* (direita) das linhagens resistentes ao MTX apresentadas na figura A, hibridizadas com uma sonda contendo a sequência da *DHFR-TS*. Cr. 6 Cromossomo 6. As setas indicam as amplificações lineares detectadas.

Apêndice C. Publicações

Molecular Microbiology (2016) 101(6), 1054–1068 ■

doi:10.1111/mmi.13441
First published online 19 July 2016

Functional compartmentalization of Rad9 and Hus1 reveals diverse assembly of the 9-1-1 complex components during the DNA damage response in *Leishmania*

Jeziel D. Damasceno,¹ Ricardo Obonaga,¹
Elaine V. Santos,¹ Alan Scott,²
Richard McCulloch² and Luiz R. O. Tosi^{1*}

¹Department of Cell and Molecular Biology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brazil.

²The Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology, Institute of Infection, Immunity and Inflammation, University of Glasgow; 120 University Place, Glasgow, G128TA, UK.

Summary

forms an alternative complex and that some of LmHus1 exists as a monomer. We propose that the diverse assembly of the *Leishmania* 9-1-1 subunits mediates functional compartmentalization, which has a direct impact on the response to genotoxic stress.

Introduction

Preservation and transmission of the eukaryotic genome rely on the cell's ability to detect and repair DNA damage. Thus, an extensive network of pathways coordinates DNA damage sensing, cell cycle progression and DNA repair processes. The Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1)

6. REFERÊNCIAS

- Adams, K. E., A. L. Medhurst, D. A. Dart and N. D. Lakin (2006). "Recruitment of ATR to sites of ionising radiation-induced DNA damage requires ATM and components of the MRN protein complex." *Oncogene* **25**(28): 3894-3904.
- Akopyants, N. S., N. Kimblin, N. Secundino, R. Patrick, N. Peters, P. Lawyer, D. E. Dobson, S. M. Beverley and D. L. Sacks (2009). "Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector." *Science* **324**(5924): 265-268.
- Alver, R. C., T. Zhang, A. Josephrajan, B. L. Fultz, C. J. Hendrix, S. Das-Bradoo and A. K. Bielinsky (2014). "The N-terminus of Mcm10 is important for interaction with the 9-1-1 clamp and in resistance to DNA damage." *Nucleic Acids Res* **42**(13): 8389-8404.
- Bello, A. R., B. Nare, D. Freedman, L. Hardy and S. M. Beverley (1994). "PTR1: a reductase mediating salvage of oxidized pteridines and methotrexate resistance in the protozoan parasite *Leishmania major*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(24): 11442-11446.
- Bermudez, V. P., L. A. Lindsey-Boltz, A. J. Cesare, Y. Maniwa, J. D. Griffith, J. Hurwitz and A. Sancar (2003). "Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 1633-1638.
- Bessat, M. and K. Ersfeld (2009). "Functional characterization of cohesin SMC3 and separase and their roles in the segregation of large and minichromosomes in *Trypanosoma brucei*." *Mol Microbiol* **71**(6): 1371-1385.
- Besteiro, S., R. A. Williams, G. H. Coombs and J. C. Mottram (2007). "Protein turnover and differentiation in *Leishmania*." *Int J Parasitol* **37**(10): 1063-1075.
- Beverley, S. M. (1988). "Characterization of the 'unusual' mobility of large circular DNAs in pulsed field-gradient electrophoresis." *Nucleic Acids Res* **16**(3): 925-939.
- Beverley, S. M. (1991). "Gene amplification in *Leishmania*." *Annu Rev Microbiol* **45**: 417-444.
- Beverley, S. M., J. A. Coderre, D. V. Santi and R. T. Schimke (1984). "Unstable DNA amplifications in methotrexate-resistant *Leishmania* consist of extrachromosomal circles which relocalize during stabilization." *Cell* **38**(2): 431-439.
- Beverley, S. M., T. E. Ellenberger and J. S. Cordingley (1986). "Primary structure of the gene encoding the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase of *Leishmania major*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(8): 2584-2588.
- Blackford, A. N. and S. P. Jackson (2017). "ATR, ATM, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response." *Mol Cell* **66**(6): 801-817.
- Blaikley, E. J., H. Tinline-Purvis, T. R. Kasperek, S. Marguerat, S. Sarkar, L. Hulme, S. Hussey, B. Y. Wee, R. S. Deegan, C. A. Walker, C. C. Pai, J. Bahler, T. Nakagawa and T. C. Humphrey (2014). "The DNA damage checkpoint pathway promotes extensive resection and nucleotide synthesis to facilitate homologous recombination repair and genome stability in fission yeast." *Nucleic Acids Res* **42**(9): 5644-5656.
- Bolderson, E., N. Tomimatsu, D. J. Richard, D. Boucher, R. Kumar, T. K. Pandita, S. Burma and K. K. Khanna (2010). "Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks." *Nucleic Acids Res* **38**(6): 1821-1831.
- Boucher, N., Y. Wu, C. Dumas, M. Dube, D. Sereno, M. Breton and B. Papadopoulou (2002). "A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element." *J Biol Chem* **277**(22): 19511-19520.

- Boutros, R., C. Dozier and B. Ducommun (2006). "The when and wheres of CDC25 phosphatases." *Curr Opin Cell Biol* **18**(2): 185-191.
- Bowman, G. D., M. O'Donnell and J. Kuriyan (2004). "Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp-clamp loader complex." *Nature* **429**(6993): 724-730.
- Bringaud, F., M. Muller, G. C. Cerqueira, M. Smith, A. Rochette, N. M. El-Sayed, B. Papadopoulou and E. Ghedin (2007). "Members of a large retroposon family are determinants of post-transcriptional gene expression in Leishmania." *PLoS Pathog* **3**(9): 1291-1307.
- Britto, C., C. Ravel, P. Bastien, C. Blaineau, M. Pages, J. P. Dedet and P. Wincker (1998). "Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World Leishmania genomes." *Gene* **222**(1): 107-117.
- Buisson, R., J. L. Boisvert, C. H. Benes and L. Zou (2015). "Distinct but Concerted Roles of ATR, DNA-PK, and Chk1 in Countering Replication Stress during S Phase." *Mol Cell* **59**(6): 1011-1024.
- Buisson, R., J. Niraj, A. Rodrigue, C. K. Ho, J. Kreuzer, T. K. Foo, E. J. Hardy, G. Dellaire, W. Haas, B. Xia, J. Y. Masson and L. Zou (2017). "Coupling of Homologous Recombination and the Checkpoint by ATR." *Mol Cell* **65**(2): 336-346.
- Callahan, H. L. and S. M. Beverley (1991). "Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in Leishmania." *J Biol Chem* **266**(28): 18427-18430.
- Ciccia, A. and S. J. Elledge (2010). "The DNA damage response: making it safe to play with knives." *Mol Cell* **40**(2): 179-204.
- Coderre, J. A., S. M. Beverley, R. T. Schimke and D. V. Santi (1983). "Overproduction of a bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant Leishmania tropica." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(8): 2132-2136.
- Conti, C., J. A. Seiler and Y. Pommier (2007). "The mammalian DNA replication elongation checkpoint: implication of Chk1 and relationship with origin firing as determined by single DNA molecule and single cell analyses." *Cell Cycle* **6**(22): 2760-2767.
- Cortez, D., S. Guntuku, J. Qin and S. J. Elledge (2001). "ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling." *Science* **294**(5547): 1713-1716.
- Cotta-Ramusino, C., D. Fachinetti, C. Lucca, Y. Doksan, M. Lopes, J. Sogo and M. Foiani (2005). "Exo1 processes stalled replication forks and counteracts fork reversal in checkpoint-defective cells." *Mol Cell* **17**(1): 153-159.
- Cotta-Ramusino, C., E. R. McDonald, 3rd, K. Hurov, M. E. Sowa, J. W. Harper and S. J. Elledge (2011). "A DNA damage response screen identifies RHINO, a 9-1-1 and TopBP1 interacting protein required for ATR signaling." *Science* **332**(6035): 1313-1317.
- Couch, F. B., C. E. Bansbach, R. Driscoll, J. W. Luzwick, G. G. Glick, R. Betous, C. M. Carroll, S. Y. Jung, J. Qin, K. A. Cimprich and D. Cortez (2013). "ATR phosphorylates SMARCA1 to prevent replication fork collapse." *Genes Dev* **27**(14): 1610-1623.
- Cruz, A. K., R. Titus and S. M. Beverley (1993). "Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in Leishmania by targeting." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(4): 1599-1603.
- Cunningham, M. L. and S. M. Beverley (2001). "Pteridine salvage throughout the Leishmania infectious cycle: implications for antifolate chemotherapy." *Mol Biochem Parasitol* **113**(2): 199-213.

- Chang, D. Y. and A. L. Lu (2005). "Interaction of checkpoint proteins Hus1/Rad1/Rad9 with DNA base excision repair enzyme MutY homolog in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*." *J Biol Chem* **280**(1): 408-417.
- Charest, H. and G. Matlashewski (1994). "Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene." *Mol Cell Biol* **14**(5): 2975-2984.
- Chester, M., J. P. Gallagher, V. V. Symonds, A. V. Cruz da Silva, E. V. Mavrodiev, A. R. Leitch, P. S. Soltis and D. E. Soltis (2012). "Extensive chromosomal variation in a recently formed natural allopolyploid species, *Tragopogon miscellus* (Asteraceae)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(4): 1176-1181.
- Damasceno, J. D., V. S. Nunes and L. R. Tosi (2013). "LmHus1 is required for the DNA damage response in *Leishmania major* and forms a complex with an unusual Rad9 homologue." *Mol Microbiol* **90**(5): 1074-1087.
- Damasceno, J. D., R. Obonaga, E. V. Santos, A. Scott, R. McCulloch and L. R. Tosi (2016). "Functional compartmentalization of Rad9 and Hus1 reveals diverse assembly of the 9-1-1 complex components during the DNA damage response in *Leishmania*." *Mol Microbiol* **101**(6): 1054-1068.
- Daniels, J. P., K. Gull and B. Wickstead (2010). "Cell biology of the trypanosome genome." *Microbiol Mol Biol Rev* **74**(4): 552-569.
- De Piccoli, G., Y. Katou, T. Itoh, R. Nakato, K. Shirahige and K. Labib (2012). "Replisome stability at defective DNA replication forks is independent of S phase checkpoint kinases." *Mol Cell* **45**(5): 696-704.
- Delacroix, S., J. M. Wagner, M. Kobayashi, K. Yamamoto and L. M. Karnitz (2007). "The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1." *Genes Dev* **21**(12): 1472-1477.
- Desjeux, P. and J. Alvar (2003). "Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe." *Ann Trop Med Parasitol* **97 Suppl 1**: 3-15.
- Dias, F. C., J. C. Ruiz, W. C. Lopes, F. M. Squina, A. Renzi, A. K. Cruz and L. R. Tosi (2007). "Organization of H locus conserved repeats in *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* correlates with lack of gene amplification and drug resistance." *Parasitol Res* **101**(3): 667-676.
- Dionne, I., R. K. Nookala, S. P. Jackson, A. J. Doherty and S. D. Bell (2003). "A heterotrimeric PCNA in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*." *Mol Cell* **11**(1): 275-282.
- Dore, A. S., M. L. Kilkenny, N. J. Rzechorzek and L. H. Pearl (2009). "Crystal structure of the rad9-rad1-hus1 DNA damage checkpoint complex--implications for clamp loading and regulation." *Mol Cell* **34**(6): 735-745.
- Downing, T., H. Imamura, S. Decuypere, T. G. Clark, G. H. Coombs, J. A. Cotton, J. D. Hilley, S. de Doncker, I. Maes, J. C. Mottram, M. A. Quail, S. Rijal, M. Sanders, G. Schonian, O. Stark, S. Sundar, M. Vanaerschot, C. Hertz-Fowler, J. C. Dujardin and M. Berriman (2011). "Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance." *Genome Res* **21**(12): 2143-2156.
- Drummelsmith, J., V. Brochu, I. Girard, N. Messier and M. Ouellette (2003). "Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms." *Mol Cell Proteomics* **2**(3): 146-155.
- Dubessay, P., C. Ravel, P. Bastien, M. F. Lignon, B. Ullman, M. Pages and C. Blaineau (2001). "Effect of large targeted deletions on the mitotic stability of an extra chromosome mediating drug resistance in *Leishmania*." *Nucleic Acids Res* **29**(15): 3231-3240.

- Dujardin, J. C., A. Mannaert, C. Durrant and J. A. Cotton (2014). "Mosaic aneuploidy in Leishmania: the perspective of whole genome sequencing." *Trends Parasitol* **30**(12): 554-555.
- Duursma, A. M., R. Driscoll, J. E. Elias and K. A. Cimprich (2013). "A role for the MRN complex in ATR activation via TOPBP1 recruitment." *Mol Cell* **50**(1): 116-122.
- Dye, C. and B. G. Williams (1993). "Malnutrition, age and the risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revisited." *Proc Biol Sci* **254**(1339): 33-39.
- El-Sayed, N. M., P. J. Myler, G. Blandin, M. Berriman, J. Crabtree, G. Aggarwal, E. Caler, H. Renauld, E. A. Worthey, C. Hertz-Fowler, E. Ghedin, C. Peacock, D. C. Bartholomeu, B. J. Haas, A. N. Tran, J. R. Wortman, U. C. Alsmark, S. Angiuoli, A. Anupama, J. Badger, F. Bringaud, E. Cadag, J. M. Carlton, G. C. Cerqueira, T. Creasy, A. L. Delcher, A. Djikeng, T. M. Embley, C. Hauser, A. C. Ivens, S. K. Kummerfeld, J. B. Pereira-Leal, D. Nilsson, J. Peterson, S. L. Salzberg, J. Shallom, J. C. Silva, J. Sundaram, S. Westenberger, O. White, S. E. Melville, J. E. Donelson, B. Andersson, K. D. Stuart and N. Hall (2005). "Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa." *Science* **309**(5733): 404-409.
- Ellenberger, T. E. and S. M. Beverley (1989). "Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in Leishmania major." *J Biol Chem* **264**(25): 15094-15103.
- Ellison, V. and B. Stillman (2003). "Biochemical characterization of DNA damage checkpoint complexes: clamp loader and clamp complexes with specificity for 5' recessed DNA." *PLoS Biol* **1**(2): E33.
- Errico, A. and V. Costanzo (2012). "Mechanisms of replication fork protection: a safeguard for genome stability." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **47**(3): 222-235.
- Falck, J., J. Coates and S. P. Jackson (2005). "Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage." *Nature* **434**(7033): 605-611.
- Fernandez-Capetillo, O., H. T. Chen, A. Celeste, I. Ward, P. J. Romanienko, J. C. Morales, K. Naka, Z. Xia, R. D. Camerini-Otero, N. Motoyama, P. B. Carpenter, W. M. Bonner, J. Chen and A. Nussenzweig (2002). "DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1." *Nat Cell Biol* **4**(12): 993-997.
- Gagneux, S., C. D. Long, P. M. Small, T. Van, G. K. Schoolnik and B. J. Bohannon (2006). "The competitive cost of antibiotic resistance in Mycobacterium tuberculosis." *Science* **312**(5782): 1944-1946.
- Garcia-Muse, T. and A. Aguilera (2016). "Transcription-replication conflicts: how they occur and how they are resolved." *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**(9): 553-563.
- Geretti, A. M. (2005). "The clinical significance of viral fitness." *J HIV Ther* **10**(1): 6-10.
- Ghedin, E., W. W. Zhang, H. Charest, S. Sundar, R. T. Kenney and G. Matlashewski (1997). "Antibody response against a Leishmania donovani amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis." *Clin Diagn Lab Immunol* **4**(5): 530-535.
- Glover, L. and D. Horn (2012). "Trypanosomal histone gammaH2A and the DNA damage response." *Mol Biochem Parasitol* **183**(1): 78-83.
- Gohler, T., S. Sabbioneda, C. M. Green and A. R. Lehmann (2011). "ATR-mediated phosphorylation of DNA polymerase eta is needed for efficient recovery from UV damage." *J Cell Biol* **192**(2): 219-227.
- Gordon, D. J., B. Resio and D. Pellman (2012). "Causes and consequences of aneuploidy in cancer." *Nat Rev Genet* **13**(3): 189-203.
- Gratzner, H. G. (1982). "Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication." *Science* **218**(4571): 474-475.

- Grondin, K., B. Papadopoulou and M. Ouellette (1993). "Homologous recombination between direct repeat sequences yields P-glycoprotein containing amplicons in arsenite resistant *Leishmania*." Nucleic Acids Res **21**(8): 1895-1901.
- Grondin, K., G. Roy and M. Ouellette (1996). "Formation of extrachromosomal circular amplicons with direct or inverted duplications in drug-resistant *Leishmania tarentolae*." Mol Cell Biol **16**(7): 3587-3595.
- Grumont, R., W. L. Washtien, D. Caput and D. V. Santi (1986). "Bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase from *Leishmania tropica*: sequence homology with the corresponding monofunctional proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(15): 5387-5391.
- Guan, X., A. Madabushi, D. Y. Chang, M. E. Fitzgerald, G. Shi, A. C. Drohat and A. L. Lu (2007). "The human checkpoint sensor Rad9-Rad1-Hus1 interacts with and stimulates DNA repair enzyme TDG glycosylase." Nucleic Acids Res **35**(18): 6207-6218.
- Haahr, P., S. Hoffmann, M. A. Tollenaere, T. Ho, L. I. Toledo, M. Mann, S. Bekker-Jensen, M. Raschle and N. Mailand (2016). "Activation of the ATR kinase by the RPA-binding protein ETAA1." Nat Cell Biol **18**(11): 1196-1207.
- Haile, S., A. Dupe and B. Papadopoulou (2008). "Deadenylation-independent stage-specific mRNA degradation in *Leishmania*." Nucleic Acids Res **36**(5): 1634-1644.
- Haile, S. and B. Papadopoulou (2007). "Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa." Curr Opin Microbiol **10**(6): 569-577.
- Haimeur, A. and M. Ouellette (1998). "Gene amplification in *Leishmania tarentolae* selected for resistance to sodium stibogluconate." Antimicrob Agents Chemother **42**(7): 1689-1694.
- Harhay, M. O., P. L. Olliaro, D. L. Costa and C. H. Costa (2011). "Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil." Trends Parasitol **27**(9): 403-409.
- Harper, J. W. and S. J. Elledge (2007). "The DNA damage response: ten years after." Mol Cell **28**(5): 739-745.
- Hassold, T. and P. Hunt (2001). "To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy." Nat Rev Genet **2**(4): 280-291.
- Hightower, R. C. and D. V. Santi (1989). "Migration properties of circular DNAs using orthogonal-field-alternation gel electrophoresis." Electrophoresis **10**(5-6): 283-290.
- Hose, J., C. M. Yong, M. Sardi, Z. Wang, M. A. Newton and A. P. Gasch (2015). "Dosage compensation can buffer copy-number variation in wild yeast." Elife **4**.
- Imamura, H., T. Downing, F. Van den Broeck, M. J. Sanders, S. Rijal, S. Sundar, A. Mannaert, M. Vanaerschot, M. Berg, G. De Muylder, F. Dumetz, B. Cuypers, I. Maes, M. Domagalska, S. Decuypere, K. Rai, S. Uranw, N. R. Bhattarai, B. Khanal, V. K. Prajapati, S. Sharma, O. Stark, G. Schonian, H. P. De Koning, L. Settimo, B. Vanhollebeke, S. Roy, B. Ostyn, M. Boelaert, L. Maes, M. Berriman, J. C. Dujardin and J. A. Cotton (2016). "Evolutionary genomics of epidemic visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent." Elife **5**.
- Ivanetich, K. M. and D. V. Santi (1990). "Bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in protozoa." FASEB J **4**(6): 1591-1597.
- Ivens, A. C., C. S. Peacock, E. A. Worthey, L. Murphy, G. Aggarwal, M. Berriman, E. Sisk, M. A. Rajandream, E. Adlem, R. Aert, A. Anupama, Z. Apostolou, P. Attipoe, N. Bason, C. Bauser, A. Beck, S. M. Beverley, G. Bianchetti, K. Borzym, G. Bothe, C. V. Bruschi, M. Collins, E. Cadag, L. Ciarloni, C. Clayton, R. M. Coulson, A. Cronin, A. K. Cruz, R. M. Davies, J. De Gaudenzi, D. E. Dobson, A. Duesterhoeft, G. Fazelina, N. Fosker, A. C. Frasch, A. Fraser, M. Fuchs, C. Gabel, A. Goble, A. Goffeau, D. Harris, C. Hertz-Fowler, H. Hilbert, D. Horn, Y. Huang, S. Klages, A. Knights, M. Kube, N.

- Larke, L. Litvin, A. Lord, T. Louie, M. Marra, D. Masuy, K. Matthews, S. Michaeli, J. C. Mottram, S. Muller-Auer, H. Munden, S. Nelson, H. Norbertczak, K. Oliver, S. O'Neil, M. Pentony, T. M. Pohl, C. Price, B. Purnelle, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, R. Reinhardt, M. Rieger, J. Rinta, J. Robben, L. Robertson, J. C. Ruiz, S. Rutter, D. Saunders, M. Schafer, J. Schein, D. C. Schwartz, K. Seeger, A. Seyler, S. Sharp, H. Shin, D. Sivam, R. Squares, S. Squares, V. Tosato, C. Vogt, G. Volckaert, R. Wambutt, T. Warren, H. Wedler, J. Woodward, S. Zhou, W. Zimmermann, D. F. Smith, J. M. Blackwell, K. D. Stuart, B. Barrell and P. J. Myler (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*." Science **309**(5733): 436-442.
- Jazayeri, A., J. Falck, C. Lukas, J. Bartek, G. C. Smith, J. Lukas and S. P. Jackson (2006). "ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks." Nat Cell Biol **8**(1): 37-45.
- Jeronimo, S. M., P. Duggal, N. A. Ettinger, E. T. Nascimento, G. R. Monteiro, A. P. Cabral, N. N. Pontes, H. G. Lacerda, P. V. Queiroz, C. E. Gomes, R. D. Pearson, J. M. Blackwell, T. H. Beaty and M. E. Wilson (2007). "Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genomewide scan." J Infect Dis **196**(8): 1261-1269.
- Karlsson-Rosenthal, C. and J. B. Millar (2006). "Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery." Trends Cell Biol **16**(6): 285-292.
- Katsuno, Y., A. Suzuki, K. Sugimura, K. Okumura, D. H. Zineldeen, M. Shimada, H. Niida, T. Mizuno, F. Hanaoka and M. Nakanishi (2009). "Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(9): 3184-3189.
- Kaye, P. and P. Scott (2011). "Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface." Nat Rev Microbiol **9**(8): 604-615.
- Komatsu, K., T. Miyashita, H. Hang, K. M. Hopkins, W. Zheng, S. Cuddeback, M. Yamada, H. B. Lieberman and H. G. Wang (2000). "Human homologue of *S. pombe* Rad9 interacts with BCL-2/BCL-xL and promotes apoptosis." Nat Cell Biol **2**(1): 1-6.
- Komatsu, K., W. Wharton, H. Hang, C. Wu, S. Singh, H. B. Lieberman, W. J. Pledger and H. G. Wang (2000). "PCNA interacts with hHus1/hRad9 in response to DNA damage and replication inhibition." Oncogene **19**(46): 5291-5297.
- Kondratova, A., T. Watanabe, M. Marotta, M. Cannon, A. M. Segall, D. Serre and H. Tanaka (2015). "Replication fork integrity and intra-S phase checkpoint suppress gene amplification." Nucleic Acids Res **43**(5): 2678-2690.
- Kumagai, A. and W. G. Dunphy (2000). "Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts." Mol Cell **6**(4): 839-849.
- Kumagai, A., J. Lee, H. Y. Yoo and W. G. Dunphy (2006). "TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex." Cell **124**(5): 943-955.
- Laffitte, M. C., M. M. Genois, A. Mukherjee, D. Legare, J. Y. Masson and M. Ouellette (2014). "Formation of linear amplicons with inverted duplications in *Leishmania* requires the MRE11 nuclease." PLoS Genet **10**(12): e1004805.
- Laffitte, M. C., P. Leprohon, M. Hainse, D. Legare, J. Y. Masson and M. Ouellette (2016). "Chromosomal Translocations in the Parasite *Leishmania* by a MRE11/RAD50-Independent Microhomology-Mediated End Joining Mechanism." PLoS Genet **12**(6): e1006117.
- Laffitte, M. N., P. Leprohon, B. Papadopoulou and M. Ouellette (2016). "Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance." F1000Res **5**: 2350.
- Lavin, M. F. (2008). "Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(10): 759-769.

- Lee, J. and W. G. Dunphy (2010). "Rad17 plays a central role in establishment of the interaction between TopBP1 and the Rad9-Hus1-Rad1 complex at stalled replication forks." Mol Biol Cell **21**(6): 926-935.
- Lee, J. and W. G. Dunphy (2013). "The Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) complex has a specific role in the activation of Chk1 in response to stalled replication forks." Mol Biol Cell **24**(9): 1343-1353.
- Lee, J., A. Kumagai and W. G. Dunphy (2007). "The Rad9-Hus1-Rad1 checkpoint clamp regulates interaction of TopBP1 with ATR." J Biol Chem **282**(38): 28036-28044.
- Lempiainen, H. and T. D. Halazonetis (2009). "Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks." EMBO J **28**(20): 3067-3073.
- Lenski, R. E. (1998). "Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance." Int Microbiol **1**(4): 265-270.
- Leprohon, P., D. Legare, F. Raymond, E. Madore, G. Hardiman, J. Corbeil and M. Ouellette (2009). "Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*." Nucleic Acids Res **37**(5): 1387-1399.
- Limbo, O., C. Chahwan, Y. Yamada, R. A. de Bruin, C. Wittenberg and P. Russell (2007). "Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination." Mol Cell **28**(1): 134-146.
- Lindsey-Boltz, L. A., M. G. Kemp, C. Capp and A. Sancar (2015). "RHINO forms a stoichiometric complex with the 9-1-1 checkpoint clamp and mediates ATR-Chk1 signaling." Cell Cycle **14**(1): 99-108.
- Lipoldova, M. and P. Demant (2006). "Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis." Nat Rev Genet **7**(4): 294-305.
- Liu, P., C. M. Carvalho, P. J. Hastings and J. R. Lupski (2012). "Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements." Curr Opin Genet Dev **22**(3): 211-220.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lossaint, G., M. Larroque, C. Ribeyre, N. Bec, C. Larroque, C. Decaillet, K. Gari and A. Constantinou (2013). "FANCD2 binds MCM proteins and controls replisome function upon activation of S phase checkpoint signaling." Mol Cell **51**(5): 678-690.
- Lovejoy, C. A. and D. Cortez (2009). "Common mechanisms of PIKK regulation." DNA Repair (Amst) **8**(9): 1004-1008.
- Lv, L., T. Zhang, Q. Yi, Y. Huang, Z. Wang, H. Hou, H. Zhang, W. Zheng, Q. Hao, Z. Guo, H. J. Cooke and Q. Shi (2012). "Tetraploid cells from cytokinesis failure induce aneuploidy and spontaneous transformation of mouse ovarian surface epithelial cells." Cell Cycle **11**(15): 2864-2875.
- Maia, C., V. Seblova, J. Sadlova, J. Votypka and P. Volf (2011). "Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain." PLoS Negl Trop Dis **5**(6): e1181.
- Mannaert, A., T. Downing, H. Imamura and J. C. Dujardin (2012). "Adaptive mechanisms in pathogens: universal aneuploidy in *Leishmania*." Trends Parasitol **28**(9): 370-376.
- Marheineke, K. and O. Hyrien (2004). "Control of replication origin density and firing time in *Xenopus* egg extracts: role of a caffeine-sensitive, ATR-dependent checkpoint." J Biol Chem **279**(27): 28071-28081.

- Martinez-Calvillo, S., D. Nguyen, K. Stuart and P. J. Myler (2004). "Transcription initiation and termination on Leishmania major chromosome 3." Eukaryot Cell **3**(2): 506-517.
- Martinez-Calvillo, S., K. Stuart and P. J. Myler (2005). "Ploidy changes associated with disruption of two adjacent genes on Leishmania major chromosome 1." Int J Parasitol **35**(4): 419-429.
- Martinez-Calvillo, S., S. Yan, D. Nguyen, M. Fox, K. Stuart and P. J. Myler (2003). "Transcription of Leishmania major Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region." Mol Cell **11**(5): 1291-1299.
- Matthews, K. R., C. Tschudi and E. Ullu (1994). "A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes." Genes Dev **8**(4): 491-501.
- McCall, L. I., W. W. Zhang and G. Matlashewski (2013). "Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease." PLoS Pathog **9**(1): e1003053.
- McNicoll, F., M. Muller, S. Cloutier, N. Boilard, A. Rochette, M. Dube and B. Papadopoulos (2005). "Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in Leishmania." J Biol Chem **280**(42): 35238-35246.
- Meier, A., H. Fiegler, P. Munoz, P. Ellis, D. Rigler, C. Langford, M. A. Blasco, N. Carter and S. P. Jackson (2007). "Spreading of mammalian DNA-damage response factors studied by ChIP-chip at damaged telomeres." EMBO J **26**(11): 2707-2718.
- Miyata, T., H. Suzuki, T. Oyama, K. Mayanagi, Y. Ishino and K. Morikawa (2005). "Open clamp structure in the clamp-loading complex visualized by electron microscopic image analysis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 13795-13800.
- Mukherjee, A., S. Boisvert, R. L. Monte-Neto, A. C. Coelho, F. Raymond, R. Mukhopadhyay, J. Corbeil and M. Ouellette (2013). "Telomeric gene deletion and intrachromosomal amplification in antimony-resistant Leishmania." Mol Microbiol **88**(1): 189-202.
- Muller, M., P. K. Padmanabhan and B. Papadopoulos (2010). "Selective inactivation of SIDER2 retroposon-mediated mRNA decay contributes to stage- and species-specific gene expression in Leishmania." Mol Microbiol **77**(2): 471-491.
- Murphy, A. K., M. Fitzgerald, T. Ro, J. H. Kim, A. I. Rabinowitsch, D. Chowdhury, C. L. Schildkraut and J. A. Borowiec (2014). "Phosphorylated RPA recruits PALB2 to stalled DNA replication forks to facilitate fork recovery." J Cell Biol **206**(4): 493-507.
- Myers, J. S. and D. Cortez (2006). "Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11." J Biol Chem **281**(14): 9346-9350.
- Nare, B., J. Luba, L. W. Hardy and S. Beverley (1997). "New approaches to Leishmania chemotherapy: pteridine reductase 1 (PTR1) as a target and modulator of antifolate sensitivity." Parasitology **114** Suppl: S101-110.
- Natera, S., C. Machuca, M. Padron-Nieves, A. Romero, E. Diaz and A. Ponte-Sucre (2007). "Leishmania spp.: proficiency of drug-resistant parasites." Int J Antimicrob Agents **29**(6): 637-642.
- Ngo, G. H., L. Balakrishnan, M. Dubarry, J. L. Campbell and D. Lydall (2014). "The 9-1-1 checkpoint clamp stimulates DNA resection by Dna2-Sgs1 and Exo1." Nucleic Acids Res **42**(16): 10516-10528.
- Ngo, G. H. and D. Lydall (2015). "The 9-1-1 checkpoint clamp coordinates resection at DNA double strand breaks." Nucleic Acids Res **43**(10): 5017-5032.
- Olmo, A., R. Arrebola, V. Bernier, D. Gonzalez-Pacanowska and L. M. Ruiz-Perez (1995). "Co-existence of circular and multiple linear amplicons in methotrexate-resistant Leishmania." Nucleic Acids Res **23**(15): 2856-2864.

- Ouellette, M., F. Fase-Fowler and P. Borst (1990). "The amplified H circle of methotrexate-resistant leishmania tarentolae contains a novel P-glycoprotein gene." EMBO J **9**(4): 1027-1033.
- Ouellette, M., E. Hettema, D. Wust, F. Fase-Fowler and P. Borst (1991). "Direct and inverted DNA repeats associated with P-glycoprotein gene amplification in drug resistant Leishmania." EMBO J **10**(4): 1009-1016.
- Ouellette, M., D. Legare, A. Haimeur, K. Grondin, G. Roy, C. Brochu and B. Papadopoulou (1998). "ABC transporters in Leishmania and their role in drug resistance." Drug Resist Updat **1**(1): 43-48.
- Pandita, R. K., G. G. Sharma, A. Laszlo, K. M. Hopkins, S. Davey, M. Chakhparonian, A. Gupta, R. J. Wellinger, J. Zhang, S. N. Powell, J. L. Roti Roti, H. B. Lieberman and T. K. Pandita (2006). "Mammalian Rad9 plays a role in telomere stability, S- and G2-phase-specific cell survival, and homologous recombinational repair." Mol Cell Biol **26**(5): 1850-1864.
- Papadopoulou, B., G. Roy, S. Dey, B. P. Rosen and M. Ouellette (1994). "Contribution of the Leishmania P-glycoprotein-related gene ltpgpA to oxyanion resistance." J Biol Chem **269**(16): 11980-11986.
- Papadopoulou, B., G. Roy, W. Mourad, E. Leblanc and M. Ouellette (1994). "Changes in folate and pterin metabolism after disruption of the Leishmania H locus short chain dehydrogenase gene." J Biol Chem **269**(10): 7310-7315.
- Papadopoulou, B., G. Roy and M. Ouellette (1992). "A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of Leishmania." EMBO J **11**(10): 3601-3608.
- Papadopoulou, B., G. Roy and M. Ouellette (1993). "Frequent amplification of a short chain dehydrogenase gene as part of circular and linear amplicons in methotrexate resistant Leishmania." Nucleic Acids Res **21**(18): 4305-4312.
- Peacock, C. S., K. Seeger, D. Harris, L. Murphy, J. C. Ruiz, M. A. Quail, N. Peters, E. Adlem, A. Tivey, M. Aslett, A. Kerhornou, A. Ivens, A. Fraser, M. A. Rajandream, T. Carver, H. Norbertczak, T. Chillingworth, Z. Hance, K. Jagels, S. Moule, D. Ormond, S. Rutter, R. Squares, S. Whitehead, E. Rabinowitsch, C. Arrowsmith, B. White, S. Thurston, F. Bringaud, S. L. Baldauf, A. Faulconbridge, D. Jeffares, D. P. Depledge, S. O. Oyola, J. D. Hilley, L. O. Brito, L. R. Tosi, B. Barrell, A. K. Cruz, J. C. Mottram, D. F. Smith and M. Berriman (2007). "Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease." Nat Genet **39**(7): 839-847.
- Rogers, M. B., J. D. Hilley, N. J. Dickens, J. Wilkes, P. A. Bates, D. P. Depledge, D. Harris, Y. Her, P. Herzyk, H. Imamura, T. D. Otto, M. Sanders, K. Seeger, J. C. Dujardin, M. Berriman, D. F. Smith, C. Hertz-Fowler and J. C. Mottram (2011). "Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of Leishmania." Genome Res **21**(12): 2129-2142.
- Saldivar, J. C., D. Cortez and K. A. Cimprich (2017). "The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome." Nat Rev Mol Cell Biol **18**(10): 622-636.
- Sale, J. E. (2013). "Translesion DNA synthesis and mutagenesis in eukaryotes." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(3): a012708.
- Sartori, A. A., C. Lukas, J. Coates, M. Mistrik, S. Fu, J. Bartek, R. Baer, J. Lukas and S. P. Jackson (2007). "Human CtIP promotes DNA end resection." Nature **450**(7169): 509-514.
- Savic, V., B. Yin, N. L. Maas, A. L. Bredemeyer, A. C. Carpenter, B. A. Helmink, K. S. Yang-lott, B. P. Sleckman and C. H. Bassing (2009). "Formation of dynamic gamma-H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin." Mol Cell **34**(3): 298-310.

- Seiler, J. A., C. Conti, A. Syed, M. I. Aladjem and Y. Pommier (2007). "The intra-S-phase checkpoint affects both DNA replication initiation and elongation: single-cell and -DNA fiber analyses." *Mol Cell Biol* **27**(16): 5806-5818.
- Selmecki, A., A. Forche and J. Berman (2010). "Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*." *Eukaryot Cell* **9**(7): 991-1008.
- Shechter, D., V. Costanzo and J. Gautier (2004). "ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing." *Nat Cell Biol* **6**(7): 648-655.
- Shiloh, Y. (2003). "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity." *Nat Rev Cancer* **3**(3): 155-168.
- Shor, E. and D. S. Perlin (2015). "Coping with stress and the emergence of multidrug resistance in fungi." *PLoS Pathog* **11**(3): e1004668.
- Smirnova, E., M. Toueille, E. Markkanen and U. Hubscher (2005). "The human checkpoint sensor and alternative DNA clamp Rad9-Rad1-Hus1 modulates the activity of DNA ligase I, a component of the long-patch base excision repair machinery." *Biochem J* **389**(Pt 1): 13-17.
- Sohn, S. Y. and Y. Cho (2009). "Crystal structure of the human rad9-hus1-rad1 clamp." *J Mol Biol* **390**(3): 490-502.
- Somyajit, K., S. Basavaraju, R. Scully and G. Nagaraju (2013). "ATM- and ATR-mediated phosphorylation of XRCC3 regulates DNA double-strand break-induced checkpoint activation and repair." *Mol Cell Biol* **33**(9): 1830-1844.
- St Onge, R. P., B. D. Besley, J. L. Pelley and S. Davey (2003). "A role for the phosphorylation of hRad9 in checkpoint signaling." *J Biol Chem* **278**(29): 26620-26628.
- Sterkers, Y., L. Crobu, L. Lachaud, M. Pages and P. Bastien (2014). "Parasexuality and mosaic aneuploidy in *Leishmania*: alternative genetics." *Trends Parasitol* **30**(9): 429-435.
- Sterkers, Y., L. Lachaud, N. Bourgeois, L. Crobu, P. Bastien and M. Pages (2012). "Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*." *Mol Microbiol* **86**(1): 15-23.
- Sterkers, Y., L. Lachaud, L. Crobu, P. Bastien and M. Pages (2011). "FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*." *Cell Microbiol* **13**(2): 274-283.
- Stracker, T. H., M. Morales, S. S. Couto, H. Hussein and J. H. Petrini (2007). "The carboxy terminus of NBS1 is required for induction of apoptosis by the MRE11 complex." *Nature* **447**(7141): 218-221.
- Symington, L. S. and J. Gautier (2011). "Double-strand break end resection and repair pathway choice." *Annu Rev Genet* **45**: 247-271.
- Tang, Y. C. and A. Amon (2013). "Gene copy-number alterations: a cost-benefit analysis." *Cell* **152**(3): 394-405.
- Techer, H., S. Koundrioukoff, A. Nicolas and M. Debatisse (2017). "The impact of replication stress on replication dynamics and DNA damage in vertebrate cells." *Nat Rev Genet* **18**(9): 535-550.
- Tiengwe, C., L. Marcello, H. Farr, N. Dickens, S. Kelly, M. Swiderski, D. Vaughan, K. Gull, J. D. Barry, S. D. Bell and R. McCulloch (2012). "Genome-wide analysis reveals extensive functional interaction between DNA replication initiation and transcription in the genome of *Trypanosoma brucei*." *Cell Rep* **2**(1): 185-197.
- Toledo, L. I., M. Altmeyer, M. B. Rask, C. Lukas, D. H. Larsen, L. K. Povlsen, S. Bekker-Jensen, N. Mailand, J. Bartek and J. Lukas (2013). "ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA." *Cell* **155**(5): 1088-1103.
- Tomimatsu, N., B. Mukherjee, K. Deland, A. Kurimasa, E. Bolderson, K. K. Khanna and S. Burma (2012). "Exo1 plays a major role in DNA end resection in humans and

influences double-strand break repair and damage signaling decisions." DNA Repair (Amst) **11**(4): 441-448.

Touelle, M., N. El-Andaloussi, I. Frouin, R. Freire, D. Funk, I. Shevelev, E. Friedrich-Heineken, G. Villani, M. O. Hottiger and U. Hubscher (2004). "The human Rad9/Rad1/Hus1 damage sensor clamp interacts with DNA polymerase beta and increases its DNA substrate utilisation efficiency: implications for DNA repair." Nucleic Acids Res **32**(11): 3316-3324.

Tsai, F. L. and M. Kai (2014). "The checkpoint clamp protein Rad9 facilitates DNA-end resection and prevents alternative non-homologous end joining." Cell Cycle **13**(21): 3460-3464.

Ubeda, J. M., D. Legare, F. Raymond, A. A. Ouameur, S. Boisvert, P. Rigault, J. Corbeil, M. J. Tremblay, M. Olivier, B. Papadopolou and M. Ouellette (2008). "Modulation of gene expression in drug resistant Leishmania is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy." Genome Biol **9**(7): R115.

Ubeda, J. M., F. Raymond, A. Mukherjee, M. Plourde, H. Gingras, G. Roy, A. Lapointe, P. Leprohon, B. Papadopolou, J. Corbeil and M. Ouellette (2014). "Genome-wide stochastic adaptive DNA amplification at direct and inverted DNA repeats in the parasite Leishmania." PLoS Biol **12**(5): e1001868.

Uziel, T., Y. Lerenthal, L. Moyal, Y. Andegeko, L. Mittelman and Y. Shiloh (2003). "Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage." EMBO J **22**(20): 5612-5621.

Vassin, V. M., R. W. Anantha, E. Sokolova, S. Kanner and J. A. Borowiec (2009). "Human RPA phosphorylation by ATR stimulates DNA synthesis and prevents ssDNA accumulation during DNA-replication stress." J Cell Sci **122**(Pt 22): 4070-4080.

Wang, X., J. Guan, B. Hu, R. S. Weiss, G. Iliakis and Y. Wang (2004). "Involvement of Hus1 in the chain elongation step of DNA replication after exposure to camptothecin or ionizing radiation." Nucleic Acids Res **32**(2): 767-775.

Wang, X., B. Hu, R. S. Weiss and Y. Wang (2006). "The effect of Hus1 on ionizing radiation sensitivity is associated with homologous recombination repair but is independent of nonhomologous end-joining." Oncogene **25**(13): 1980-1983.

Warburg, A., E. Saraiva, G. C. Lanzaro, R. G. Titus and F. Neva (1994). "Saliva of Lutzomyia longipalpis sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **345**(1312): 223-230.

Wawrousek, K. E., B. K. Fortini, P. Polaczek, L. Chen, Q. Liu, W. G. Dunphy and J. L. Campbell (2010). "Xenopus DNA2 is a helicase/nuclease that is found in complexes with replication proteins And-1/Ctf4 and Mcm10 and DSB response proteins Nbs1 and ATM." Cell Cycle **9**(6): 1156-1166.

Xu, M., L. Bai, Y. Gong, W. Xie, H. Hang and T. Jiang (2009). "Structure and functional implications of the human rad9-hus1-rad1 cell cycle checkpoint complex." J Biol Chem **284**(31): 20457-20461.

Yan, S. and W. M. Michael (2009). "TopBP1 and DNA polymerase alpha-mediated recruitment of the 9-1-1 complex to stalled replication forks: implications for a replication restart-based mechanism for ATR checkpoint activation." Cell Cycle **8**(18): 2877-2884.

Yao, N. Y., A. Johnson, G. D. Bowman, J. Kuriyan and M. O'Donnell (2006). "Mechanism of proliferating cell nuclear antigen clamp opening by replication factor C." J Biol Chem **281**(25): 17528-17539.

Yoo, H. Y., A. Kumagai, A. Shevchenko, A. Shevchenko and W. G. Dunphy (2009). "The Mre11-Rad50-Nbs1 complex mediates activation of TopBP1 by ATM." Mol Biol Cell **20**(9): 2351-2360.

- Zhang, W. W. and G. Matlashewski (2001). "Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection." Mol Microbiol **39**(4): 935-948.
- Zhang, W. W. and G. Matlashewski (2010). "Screening *Leishmania donovani*-specific genes required for visceral infection." Mol Microbiol **77**(2): 505-517.
- Zhang, W. W., S. Mendez, A. Ghosh, P. Myler, A. Ivens, J. Clos, D. L. Sacks and G. Matlashewski (2003). "Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection." J Biol Chem **278**(37): 35508-35515.
- Zhou, B. B. and S. J. Elledge (2000). "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." Nature **408**(6811): 433-439.
- Zhou, Z. W., C. Liu, T. L. Li, C. Bruhn, A. Krueger, W. Min, Z. Q. Wang and A. M. Carr (2013). "An essential function for the ATR-activation-domain (AAD) of TopBP1 in mouse development and cellular senescence." PLoS Genet **9**(8): e1003702.
- Zou, L. and S. J. Elledge (2003). "Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes." Science **300**(5625): 1542-1548.
- Zou, L., D. Liu and S. J. Elledge (2003). "Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 13827-13832.