SIMONE GUEDES CALDERANO

Dinâmica Molecular no Núcleo de
Trypanosoma cruzi

Dissertação apresentada ao Departamento
de Parasitologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Mestre
em Ciências.

São Paulo

2008

Simone Guedes Calderano

Dinâmica Molecular no Núcleo de *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

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

São Paulo

2008

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

© reprodução total

Calderano, Simone Guedes.

Dinâmica molecular no núcleo de *Trypanossoma cruzi* / Simone Guedes Calderano. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Maria Carolina Elias.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Replicação de *Trypanosoma cruzi*.

Versão do título para o inglês: Molecular dynamics at *Trypanosoma cruzi* nucleus.

Descritores: 1. Replicação 2. PCNA 3. ORC 4. Organização Nuclear 5. *Trypanossoma cruzi* 6. Sítios de replicação I. Elias, Maria Carolina II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. III. Título.

ICB/SBIB192/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Simone Guedes Calderano.

Título da Dissertação: Dinâmica molecular no núcleo de *Trypanossoma cruzi*.

Orientador(a): Maria Carolina Elias.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 199/07, referente ao projeto intitulado *Caracterização dos sítios de replicação no núcleo de Trypanosoma cruzi* sob a responsabilidade de Simone Guedes Calderano, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 27 de fevereiro de 2007.

PROF. DR. CARLOS PELLISCHI TABORDA
Vice-Coordenador da CEEA - ICB/USP

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

Ao meu marido Wagner pelo apoio incondicional.

Aos meus pais, Lemuel e Elena, por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar mais esse sonho em realidade.

Ao meu marido Wagner, o amor da minha vida, por todo amor, carinho e incentivo diário.

Aos meus pais, Lemuel e Elena, por todo amor, dedicação e esforço que me fizeram chegar até aqui.

Às minhas irmãs, Patrícia e Ester, por todo amor e amizade que permanecem para sempre.

Ao meu lindo sobrinho, Nicolas, que mesmo estando longe já conquistou todo meu coração.

Aos meus cunhados, Natan e Douglas, pela grande amizade que os fizeram como os irmãos que não tive.

Aos meus sogros, Tião e Rita, por todo carinho e por me receberam em sua família como filha.

Aos meus outros cunhados, Débora e Rafa, pela grande amizade. Vocês também são meus irmãos do coração.

A todos estes que formam a minha querida família que eu amo tanto. Sem vocês a vida não seria tão boa como é.

À minha orientadora, Maria Carolina Elias, por ser como é. Sua paciência, transparência e profissionalismo me servem de exemplo. Obrigada pela oportunidade!!

Aos amigos de bancada, Patrícia pelas diversas conversas que fizeram nosso dia-a-dia muito mais gostoso e Luiz por sempre estar pronto a ajudar.

À chefe do departamento, Toshie Kawano, pelo carinho e amizade.

Aos pesquisadores, Lincoln, Enéas e Eliana, pela amizade.

Aos colegas do laboratório: Vanessa, Edith (obrigada pelas caronas), Lenita, Pati Aoki, Ludmila, Rebeca, Alessandro, Maria Cristina, Mariana, Camila, Priscila e Orlando.

Aos funcionários: Carlos, Lurdinha, Cris e Jurema.

Ao técnico do microscópio confocal, Alex, por suas preciosas dicas.

Ao Dr. Sérgio Schenkman, nosso colaborador, pelas conversas empolgadas sobre nosso trabalho.

Ao pessoal do laboratório do Dr. Sérgio Schenkman: Teresa, Mococa, Janete, Claudeci, Cláudio e especialmente à Sheila por sua ajuda.

Ao Dr. Ariel Silver e seus alunos, Lisvane, Anahí, Brian e Josué, por nos aceitarem em seus seminários semanais e pela amizade de todos vocês.

À Dr. Miriam Jasiolionis Leon, por ter me apresentado à Carol.

À minha amiga Ana Paula, pela amizade, que sei que é pra vida toda.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

O que sabemos é uma gota, o que não sabemos é um oceano.

(Isaac Newton)

RESUMO

Calderano SG. Dinâmica molecular no núcleo de *Trypanosoma cruzi* [dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Na forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de chagas, os sítios de replicação estão localizados na periferia nuclear para onde os cromossomos migram durante a fase de síntese (S) do ciclo celular. A fim de entender a dinâmica das moléculas envolvidas na replicação durante o ciclo celular de epimastigota, TcOrc/Cdc6 foi usado como marcador da maquinaria de pré-replicação e TcPCNA foi utilizado como marcador da maquinaria de replicação. Através de ensaio de imunofluorescência de cultura exponencial de epimastigota, tanto TcOrc/Cdc6 quanto TcPCNA apresentaram dois padrões de localização nuclear: (1) padrão disperso, onde as moléculas se encontram distribuídas por todo o núcleo e (2) padrão periférico onde as moléculas se concentram na periferia nuclear. Apenas as células em G1/S possuem estes dois padrões de localização de TcOrc/Cdc6 e TcPCNA, nas outras fases do ciclo (G2, mitose e citocinese) apenas o padrão disperso é encontrado. Em ensaio de dupla marcação, três combinações destes padrões foram encontradas: (1) TcOrc/Cdc6 e TcPCNA dispersos pelo espaço nuclear, (2) TcOrc/Cdc6 na periferia nuclear enquanto TcPCNA permanece disperso e (3) ambos na periferia nuclear. Com estes resultados entendemos que a dinâmica nuclear destas moléculas ocorre da seguinte maneira: no início de G1 tanto TcOrc/Cdc6 quanto TcPCNA estão dispersos pelo núcleo e ao final de G1 TcOrc/Cdc6 migra para a periferia nuclear enquanto TcPCNA permanece disperso e apenas migra para a periferia nuclear, onde a replicação ocorrerá, quando a célula entrar em S. Assim, podemos concluir que a replicação na periferia nuclear não se deve à localização prévia das moléculas de replicação nesta região, mas sim à migração das moléculas de replicação para os sítios apropriados.

Palavras-chave: Replicação; PCNA; ORC; *Trypanosoma cruzi*; sítios de replicação; organização nuclear.

ABSTRACT

Calderano SG. Molecular dynamics at *Trypanosoma cruzi* nucleus [dissertation]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

In *Trypanosoma cruzi* epimastigote, the agente of Chagas disease, the replication sites localize at nuclear periphery where the chromosomes remain constrained during the S phase of the cell cycle. In order to analyse the dynamics of molecules involved in replication during the cell cycle of epimastigote, we followed TcOrc/Cdc6 (*Trypanosoma cruzi* Orc/Cdc6) as marker for the pre-replication machinery and TcPCNA (*T. cruzi* PCNA) as marker for the replication machinery. Immunofluorescence assay of epimastigote exponential culture showed two different nuclear patterns of TcOrc/Cdc6 and TcPCNA: (1) dispersed pattern, where the molecules were spread through the nucleus and (2) peripheral pattern, where the molecules were constrained at nuclear periphery. Only G1/S cells presented both patterns and during G2, mitosis and cytokinesis only the dispersed pattern was found. In double-labeling assay of TcOrc/Cdc6 and TcPCNA three different patterns were found: (1) TcOrc/Cdc6 and TcPCNA dispersed through the nuclear space, (2) TcOrc/Cdc6 constrained at nuclear periphery and TcPCNA dispersed and (3) both molecules constrained at nuclear periphery. This data allowed us to conclude that during early G1 phase both molecules, TcOrc/Cdc6 and TcPCNA, are dispersed through the nucleus and TcOrc/Cdc6 goes to nuclear periphery during late G1 phase while TcPCNA remains dispersed. TcPCNA goes to nuclear periphery, where DNA replication will take place, when S phase starts. Thus, the replication of DNA at nuclear periphery is not due to localization of replications factors at nuclear periphery; instead it depends on the movement of these factors to the appropriated sites.

Key word: Replication; PCNA; ORC; *Trypanosoma cruzi*; replication sites; nuclear organization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Formação do complexo de pré-replicação em eucariotos.	17
Figura 1.2: Estrutura quaternária de PCNA humano.	18
Figura 1.3: Principais proteínas presentes na forquilha de replicação.	19
Figura 1.4: Sítios fixos de replicação em levedura.	22
Figura 1.5: Organização nuclear dos cromossomos e genes.	24
Figura 1.6: Estruturas do cinetoplasto e localização das proteínas envolvidas na replicação do kDNA.	27
Figura 1.7: Diferentes formas de <i>T. cruzi</i> durante seu ciclo de vida.	28
Figura 1.8: Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	29
Figura 1.9: Representação esquemática das modificações morfológicas durante o ciclo celular da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> .	30
Figura 1.10: Características morfológicas de epimastigota durante seu ciclo celular.	30
Figura 1.11: Modelo da dinâmica dos cromossomos durante ciclo celular de <i>T. cruzi</i> – epimastigota.	32
Figura 1.12: Formação do complexo de pré-replicação em eucariotos e trypanosomas.	33
Figura 1.13: Estrutura quaternária de PCNA de diferentes organismos.	34
Figura 4.1: Dois padrões de TcOrc/Cdc6 no núcleo de epimastigota.	48
Figura 4.2: Série-Z de microscopia confocal dos padrões de TcOrc/Cdc6.	49
Figura 4.3: Padrões de TcOrc/Cdc6 encontrado em núcleo de epimastigota.	50
Figura 4.4: Padrões de TcOrc/Cdc6 no núcleo de epimastigota durante o ciclo celular.	51
Figura 4.5: Imunofluorescência de TcOrc/Cdc6 ligada à cromatina.	52
Figura 4.6: Imunofluorescência de TcOrc/Cdc6 ligada à cromatina durante ciclo celular.	52
Figura 4.7: Obtenção do vetor pET28a-TcPCNA e da proteína recombinante TcPCNA.	53

Figura 4.8: <i>Imunoblotting</i> para análise de soro anti-TcPCNA de coelho e camundongo.	54
Figura 4.9: Purificação do soro de coelho anti-TcPCNA	55
Figura 4.10: Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> marcado com anti-TcPCNA.	56
Figura 4.11: Perfil de TcPCNA em epimastigotas de <i>T.cruzi</i> exposto à radiação gama.	57
Figura 4.12: Dois padrões de TcPCNA no núcleo de epimastigota.	58
Figura 4.13: Série-Z de microscopia confocal dos padrões de TcPCNA durante ciclo celular.	59
Figura 4.14: Padrões de TcPCNA no núcleo de epimastigota contendo nucléolo fluorescente.	60
Figura 4.15: Padrões de TcPCNA no núcleo de epimastigota durante o ciclo celular.	61
Figura 4.16: Incorporação de BrdU por 3h em epimastigotas.	62
Figura 4.17: TcOrc/Cdc6 e TcPCNA no núcleo de epimastigota.	63
Figura 4.18: Série-Z de TcOrc/Cdc6 e TcPCNA dispersos no núcleo de epimastigota.	64
Figura 4.19: Série-Z de TcOrc/Cdc6 periférico e TcPCNA disperso no núcleo de epimastigota.	65
Figura 4.20: Série-Z de TcOrc/Cdc6 e TcPCNA na periferia nuclear de epimastigota.	66
Figura 4.21: Aumento maior dos padrões de TcOrc/Cdc6 e TcPCNA no núcleo epimastigota.	67
Figura 5.1: Representação esquemática da dinâmica dos cromossomos, TcOrc/Cdc6 e TcPCNA no núcleo de <i>T. cruzi</i> durante o ciclo celular.	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Replicação	16
1.1.1 Eucariotos	16
a) Licenciamento das Origens de Replicação	16
b) Ativação do Complexo de Pré-Replicação	17
1.1.2 Archaea	19
1.1.3 Bactéria	19
1.2 Organização Nuclear	20
1.2.1 Organização Espaço-Temporal da Replicação	20
1.2.2 Organização da Cromatina	22
1.2.3 Organização Espacial dos Cromossomos e Genes	23
1.3 <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
1.3.1 kDNA e sua replicação	25
1.3.2 Ciclo de Vida	27
1.3.3 Epimastigota	29
1.3.4 Organização nuclear	31
a) Organização Espaço-Temporal	31
b) Organização da Cromatina	32
c) Organização Espacial dos Cromossomos e Cromatina	32
1.3.5 Replicação	33
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivos Específicos	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Cultura de Células	36
3.2 Clonagem de TcPCNA em vetor de expressão	36
3.3 Sequenciamento	36

3.4 Expressão de TcPCNA recombinante	36
3.5 Purificação de rTcPCNA	37
3.6 Análise da proteína purificada	37
3.7 Obtenção de anticorpos policlonais	37
3.8 Purificação do anticorpo	38
3.9 Adsorção de anti-TcPCNA em extrato de <i>E.coli</i> BL21	38
3.10 <i>Imunoblotting</i>	39
3.11 Imunofluorescência	39
3.12 Incorporação de Bromodeoxiuridina (BrdU)	40
3.13 Ensaio de dano ao DNA	40
3.14 Microscopia Eletrônica de Transmissão	40
 4 RESULTADOS	 42
4.1 Padrões de TcOrc/Cdc6 em núcleo de epimastigota	42
4.2 Padrões de TcOrc/Cdc6 durante ciclo celular de epimastigota	43
4.3 TcOrc/Cdc6 permanece ligado ao DNA durante ciclo celular de epimastigota	43
4.4 Obtenção de TcPCNA Recombinante	43
4.5 Anticorpo Policlonal anti-TcPCNA Reconhece Proteína em Extrato Protéico de <i>T.cruzi</i> – epimastigota	44
4.6 Anti-TcPCNA Reconhece Proteína Nuclear e Funcional	44
4.7 Padrões de TcPCNA no núcleo de <i>T. cruzi</i> em ensaios de imunofluorescência	45
4.8 Padrões de TcPCNA durante ciclo celular de epimastigota	46
4.9 Incorporação de Bromodeoxiuridina ocorre na periferia nuclear	46
4.10 Dinâmica da maquinaria de pré-replicação e replicação durante as fases G1/S de epimastigota	46
 5 DISCUSSÃO	 68
5.1 Replicação na Periferia Nuclear	68
5.2 Dinâmica da Maquinaria de Pré-replicação	68

5.3 Dinâmica da Maquinaria de Replicação	69
5.4 Dinâmica Nuclear Durante G1/S	69
5.5 Formação Auto-Organizada dos Sítios de Replicação em <i>Trypanosoma cruzi</i>	70
5.6 Por que Replicar na Periferia Nuclear?	71
 6 CONCLUSÃO	 73
 REFERÊNCIAS	 74

1 INTRODUÇÃO

Durante a evolução três linhagens celulares emergiram: bactéria, archaea e eucariotos (Woese e Fox, 1977). Todas elas apresentando dupla fita de DNA (dsDNA) e capacidade para replicá-la. O mecanismo básico de duplicação deste material genético está conservado entre estas linhagens, porém a maquinaria envolvida apresenta diferenças (McGeoch e Bell, 2008). Em eucariotos, onde há compartimentalização do DNA, tem-se observado que o núcleo apresenta alta organização e que os diferentes eventos que ocorrem em seu interior, tal como a replicação, não estão espalhados aleatoriamente, mas em sítios específicos (Misteli, 2007).

1.1 Replicação

Nos três domínios da vida o mecanismo básico de replicação consiste na ligação de proteínas específicas à seqüências de DNA, denominadas *origem de replicação*, onde ocorre a abertura da dupla fita de DNA e formação da forquilha de replicação (Zakrzewska-Czerwinska, 2007).

1.1.1 Eucariotos

Entre os eucariotos a maquinaria de replicação se apresenta muito conservada e aqui serão descritos os eventos que ocorrem em leveduras. Para que a duplicação do material genético ocorra dois eventos principais devem ocorrer: (a) o licenciamento das origens de replicação, que ocorre no final da mitose e início de G1 e (b) a ativação dos complexos de pré-replicação, que ocorre na fase de síntese (S), resultando na abertura da dupla fita de DNA permitindo sua duplicação.

a) Licenciamento das origens de replicação

O genoma dos eucariotos é muito grande e para que este seja replicado em pequeno espaço de tempo sem perder a fidelidade da cópia, várias origens de replicação nos cromossomos são necessárias. Dentre os eucariotos apenas leveduras tem uma seqüência específica de DNA conhecida para a origem de replicação que foi denominada de *Autonomous Replicating Sequences* – ARS. Ao final da mitose e início da fase G1 estas

origens de replicação são reconhecidas por um complexo protéico formado por seis subunidades denominado ORC₁₋₆ (*Origin Recognition Complex*). Após a ligação deste complexo ao DNA há o recrutamento de uma segunda proteína chamada Cdc6. ORC₁₋₆ e Cdc6 ligados ao DNA permitem que Cdt1 se ligue a eles, trazendo consigo um complexo denominado MCM₂₋₇ (*Mini-Chromosome Maintenance*). Neste ponto tem-se formado o complexo de pré-replicação (Figura 1.1), composto por ORC₁₋₆, Cdc6, Cdt1 e MCM₂₋₇, que permanece ligado ao DNA durante a fase G1 e que será ativado apenas na fase S (Bell e Dutta, 2002).

Figura 1.1: Formação do complexo de pré-replicação (Pre-RC) em eucariotos. ORC₁₋₆, as seis subunidades estão representadas como uma estrutura única denominada ORC, Cdc6, Cdt1 e MCM₂₋₇. A formação ocorre na transição das fases M (mitose) e G1 do ciclo celular. Adaptado de Machida e Dutta, 2005.

b) Ativação do Complexo de Pré-Replicação

A ativação do complexo de pré-replicação ocorre no início da fase S quando há aumento da atividade das ciclinas-CDKs (*Cyclin Dependent Kinases*) que são responsáveis por esta ativação, além de muitas outras funções, tais como regulação do ciclo celular e prevenção da re-replicação (Machida e Dutta, 2005). O complexo MCM₂₋₇ apresenta forma de anel que envolve DNA simples fita e quando o complexo de pré-replicação é ativado as MCMs, por meio da sua atividade de helicase, abrem a dupla fita de DNA (Bell e Dutta, 2002) permitindo seu acesso pelas proteínas da replicação.

Os passos que se seguem para que efetivamente tenha a formação da fita complementar ainda não estão muito bem esclarecidos, porém sabe-se que, após a abertura da dupla fita, uma proteína denominada RPA (*Replication Protein A*) se liga à fita simples de DNA estabilizando-a e protegendo-a (Barry e Bell, 2006). Em seguida a DNA polimerase- α -

primase é recrutada para iniciar a síntese da nova fita de DNA. Primeiramente ela sintetiza um *primer* de RNA e a partir deste começa a síntese da nova molécula de DNA. Ao ter-se formado uma dsDNA uma importante proteína deve ser recrutada, o PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*). PCNA é um homotrímero que possui forma de anel que é capaz de envolver DNA dupla fita (Figura 1.2). Ele é colocado na forquilha de replicação por ação da proteína RFC (*Replication Factor C*) que utilizando ATP abre o PCNA colocando-o em torno da dupla fita de DNA (Indiana e O'Donnell, 2006).

Figura 1.2: Estrutura quaternária de PCNA humano. PCNA é um homotrímero em forma de anel. Seu canal interno é capaz de envolver DNA dupla fita. Cada monômero está representado por cores diferentes: vermelho, verde e azul. Retirado de Gulbis, et al., 1996.

Com a chegada do PCNA, a DNA polimerase α -primase é substituída por outras DNA polimerases, já que PCNA atua como uma plataforma de ancoragem para estas e outras proteínas durante a síntese da nova molécula de DNA. A DNA polimerase- ϵ (épsilon) e a DNA polimerase- δ (delta) irão se ligar ao PCNA e continuar a síntese da nova fita de DNA, sendo a primeira polimerase responsável pela síntese da fita contínua (*leading strand*), e a segunda pela síntese da fita descontínua (*lagging strand*). Nesta última há formação dos fragmentos de Okazaki que devem ser unidos para formação de uma única molécula, para isso FEN1 (*flap endonuclease*) inicia a degradação do *primer* de RNA, e a DNA ligase irá promover a ligação entre os fragmentos de DNA (Figura 1.3) (Garg e Burgers, 2005).

Figura 1.3: Principais proteínas presentes na forquilha de replicação. MCM abre a dupla fita de DNA. RPA liga-se a ssDNA. PCNA serve de apoio para diferentes proteínas como as DNA polimerases e ligases. Retirado de Garg e Burgers, 2005.

1.1.2 Archaea

Archaea são procariotos que possuem muita semelhança à maquinaria de replicação, transcrição, tradução, recombinação e reparo de eucariotos (Lundgren e Bernander, 2005). Nesta linhagem evolutiva o número de origens de replicação varia entre as espécies, podendo haver apenas uma origem ou várias. A proteína que reconhece a origem de replicação é denominada Orc1/Cdc6, que é homóloga à Orc1 e Cdc6 de eucariotos. Orc1/Cdc6 se liga à origem de replicação e em seguida um homohexâmero (MCM) se junta a ele. MCM é homóloga a uma das MCMs de eucariotos, tendo também atividade de helicase. O mecanismo pelo qual MCM é recrutado ao DNA permanece incerto, mas parece ser diretamente recrutado pela Orc1/Cdc6 (Barry e Bell, 2006). A fase de síntese de DNA em archaea é muito parecida com eucariotos. RPA se liga à simples fita de DNA, após a abertura da dupla fita, e então a DNA primase sintetiza um *primer* de RNA que permite o início da formação da nova molécula de DNA. Após a formação da dupla fita de DNA, PCNA é recrutado e a DNA primase é substituída por outras DNA polimerases. Os fragmentos de Okazaki parecem ser ligados pelo mesmo mecanismo de eucariotos, como descrito acima (Barry e Bell, 2006).

1.1.3 Bactérias

Em bactérias há apenas uma origem de replicação, denominada OriC, que é uma região rica em AT. Em OriC há várias sequências de 9 pares de nucleotídeos denominadas de *DnaA boxes*. OriC é reconhecida pela proteína DnaA. Vários monômeros de DnaA se ligam

aos *DnaA boxes*, resultando na abertura local das regiões ricas em AT. Após a abertura da dupla fita de DNA DnaC é recrutado e permite que DnaB, que possui atividade de helicase, se junte à eles. DnaB forma um homohexâmero em torno da fita simples de DNA e terá por função continuar desfazendo a dupla fita de DNA durante a replicação. DnaB, já presente na forquilha, recruta outras duas proteínas DnaG e a DNA polimerase III. DnaG é uma primase que irá sintetizar o *primer* de RNA complementar à fita molde contendo cerca de 12 nucleotídeos. Neste ponto a holoenzima DNA polimerase III é capaz de sintetizar a nova molécula de DNA a partir deste *primer* (Zakrzewska-Czerwinska, 2007). Assim tem-se a progressão da forquilha e a formação da fita complementar de DNA.

1.2 Organização nuclear

O núcleo eucariótico é altamente organizado, apresentando compartimentos específicos onde ocorre o metabolismo dos ácidos nucléicos. Estes compartimentos não são envoltos por membranas, como são aqueles do citoplasma, mas são compartimentos funcionais onde a maquinaria necessária para que estes processos ocorram se encontra. Desta forma estes processos podem ser realizados em regiões nucleares específicas durante determinada fase do ciclo celular (Lamond e Spector, 2003; Misteli, 2005). Da mesma maneira que os processos nucleares estão organizados, o DNA também se organiza neste espaço nuclear, primeiramente por meio da sua compactação formando a cromatina e segundo pela distribuição não aleatória dos cromossomos, havendo territórios preferenciais de localização dentro do núcleo (Cremer, et al., 1982).

Assim, três níveis de organização do núcleo podem ser estabelecidos:

- Organização espaço-temporal dos processos nucleares;
- Organização da cromatina;
- Organização espacial dos cromossomos e genes.

1.2.1 Organização Espaço-Temporal da Replicação

A replicação, assim como todos os processos nucleares, ocorre em regiões específicas do núcleo (Lamond e Spector, 2003). A primeira evidência de que a replicação do DNA se apresenta organizada no núcleo foi vista em ensaios de incorporação de Bromodeoxiuridina - BrdU (Nakamura, et al., 1986). Este, que é um análogo de timidina, é incorporado na nova

molécula de DNA onde está acontecendo a replicação. Assim, após a incorporação de BrdU em células HeLa foram encontrados diversos pontos de replicação espalhados pelo núcleo que foram denominados de sítios de replicação (Cook, 1999). Hoje se sabe que nestes sítios de replicação são encontradas todas as proteínas requeridas para a replicação do DNA, além de fatores regulatórios do ciclo celular (Misteli, 2007). Portanto a existência destes compartimentos assegura a concentração de todos os fatores necessários para a replicação, permitindo a eficiente interação entre eles no momento da síntese da nova molécula de DNA (Chakalova, et al., 2005).

Uma das hipóteses mais aceitas atualmente é que estes sítios de replicação não permanecem montados durante todo o ciclo celular de uma célula, mas se formam durante a fase de síntese (S) do ciclo celular. A formação destes sítios parece ocorrer de maneira auto-organizada, ou seja, proteínas que se ligam ao DNA para iniciar a replicação irão recrutar outras proteínas solúveis no nucleoplasma, desta forma as diversas proteínas se reúnem em um mesmo local formando o sítio de replicação. Isso é possível já que há uma alta concentração de proteínas no núcleo (de 100 a 400mg por mL dependendo da espécie) que se difundem com facilidade pelo espaço nuclear, facilitando o encontro entre as proteínas que interagem (Misteli, 2001 e Misteli, 2007).

Recentemente um grupo do Reino Unido demonstrou que a formação de sítios de replicação em leveduras ocorre de forma auto-organizada (Kitamura, et al., 2006). Neste trabalho a formação dos sítios de replicação ocorreram apenas na fase S do ciclo destas leveduras e em células que tiveram a proteína Cdc6 deletada não foi possível observar a formação destes sítios. Cdc6 é uma proteína que faz parte do complexo de pré-replicação que se liga às origens de replicação e permitem que a replicação se inicie, portanto na falta desta proteína as demais proteínas solúveis no nucleoplasma não são recrutadas para a formação dos sítios de replicação. Todos estes dados evidenciam e comprovam pela primeira vez que a formação dos sítios de replicação ocorre de maneira auto-organizada e apenas durante uma fase específica do ciclo celular (Kitamura, et al., 2006).

Neste mesmo trabalho também foi mostrado pela primeira vez que os sítios de replicação estão fixos no núcleo enquanto o DNA se move através dele para ser duplicado. Para isso uma sequência de *operon* de bactéria foi inserida a 60 kb da origem de replicação (ARS) destas leveduras, de forma a ser facilmente localizada no núcleo pela ligação de seu repressor conjugado à GFP (Green Fluorescent Protein). Através de captura de imagens ao vivo foi possível observar a entrada deste *operon* em um sítio de replicação e sua subsequente saída já duplicado, como está esquematizado na figura 1.4, demonstrando que estes sítios de

replicação permanecem fixos, talvez interagindo com alguma estrutura da matriz nuclear, enquanto o DNA se move através dele ao ser duplicado (Kitamura, et al., 2006).

Figura 1.4: Sítios fixos de replicação em levedura. Representação esquemática dos sítios de replicação, em verde, que permanecem fixos enquanto o DNA se move através dele. A duplicação se inicia pela origem de replicação - ARS. DNA que entra no sítio em preto e DNA que sai duplicado em azul. Em vermelho o *operon* utilizado como marcador. Adaptado de Kitamura et al 2006.

Como já dito, a formação dos sítios de replicação ocorre durante a fase S do ciclo celular, mas outros eventos essenciais devem ocorrer antes desta fase para que a replicação possa ser realizada. Estes eventos e a própria replicação serão descritos a seguir.

1.2.2 Organização da Cromatina

A compartimentalização do DNA no núcleo só é possível por meio da sua compactação que ocorre pela interação do DNA com proteínas básicas denominadas histonas, formando a cromatina.

Para formação da cromatina as histonas interagem entre e si e também com o DNA. As histonas H3 e H4 formam um heterodímero que se associam formando um tetrâmero estável $(H3/H4)_2$. Heterodímeros de H2A e H2B também são formados, dois destes se juntam ao tetrâmero de $(H3/H4)_2$ formando um octâmero $(H2A/H2B)-(H4/H3)-(H3/H4)-(H2B/H2A)$. Este octâmero é capaz de se associar com cerca de 146 pares de bases de DNA, formando uma estrutura denominada nucleossomo. Neste momento a fibra formada possui aspecto de colar de contas com diâmetro de 10 nm. A compactação do DNA aumenta ainda mais com a

presença da H1. Esta possui uma região central globular e duas caudas N e C terminais. A região globular tem um domínio *winged-helix* que se associa a vários sítios dos nucleossomos, já as caudas N e C terminais podem se ligar ao DNA do nucleossomo e da região entre os nucleossomos. A região C terminal é rica em lisina, alanina, serina e prolina que facilitam a condensação da cromatina neutralizando as cargas negativas do DNA. Assim, ocorre a aproximação dos nucleossomos de forma helicoidal, formando fibras de 30 nm de diâmetro (Wolffe e Guschin, 2000). A condensação da cromatina ainda pode ser aumentada por ação de proteínas não histônicas que podem resultar em dois tipos de cromatina conforme o grau de condensação: a eucromatina (menor condensação) e a heterocromatina (maior condensação). Algumas proteínas não histônicas envolvidas na condensação da cromatina são encontradas na heterocromatina e muitas delas também estão envolvidas no silenciamento de genes (Adkins, et al., 2004). Desta forma se acreditava que a região da heterocromatina possuía genes menos ativos, onde sua maior condensação serviria de barreira para fatores de transcrição. A eucromatina, por sua vez menos condensada, estaria facilmente disponível para estes fatores, possuindo assim maior número de genes ativos (Dillon e Festenstein, 2002). Porém hoje se acredita que a heterocromatina está mais relacionada com menor densidade de genes do que com menor atividade destes. Regiões descondensadas têm alta densidade de genes enquanto as regiões condensadas possuem baixa densidade de genes (Gilbert, et al., 2004).

1.2.2 Organização espacial dos cromossomos e genes

Os diferentes cromossomos se localizam em territórios específicos no espaço nuclear (Cremer, et al., 1982). Através de hibridização *in situ* (FISH) vários grupos utilizando sondas para diferentes cromossomos mostraram que cada cromossomo ocupa um espaço determinado dentro do núcleo, que foi denominado território cromossômico (figura 1.5) (Borden e Manuelidis, 1988; Cremer, et al., 1988; Pinkel, et al. 1988). A distribuição dos territórios cromossômicos ocorre de maneira que os mesmos cromossomos permaneçam sempre próximos uns aos outros, o que poderia facilitar translocações e interações entre cromossomos específicos (Verschure, 2004).

Os territórios cromossomos possuem fronteiras, havendo o mínimo de mistura entre as cromatinas de territórios adjacentes em um núcleo interfásico (Jackson, 2003). Assim, o espaço existente entre estes territórios é denominado domínio intercromossomal e é neles que os processos nucleares, como transcrição e replicação, ocorrem (Lamond e Earnshaw, 1998).

Dentro dos territórios cromossômicos os genes também se encontram organizados. Durante a metáfase, quando há maior grau de condensação dos cromossomos, as regiões de maior e menor densidade gênica se encontram intercaladas, porém na interfase estas diferentes regiões tendem a se localizar em compartimentos específicos. As regiões de menor densidade gênica, heterocromatina, localizam-se na periferia nuclear enquanto as regiões de maior densidade gênica se localizam no centro do núcleo (Figura 1.5) (Misteli, 2007). Esta disposição espacial está muito relacionada com os processos nucleares, de forma que os genes no centro do núcleo são replicados no início de S e tem maior atividade transcricional, enquanto os genes localizados na periferia nuclear são replicados ao final da fase S e podem até mesmo estar silenciado (Ferreira, et al., 1997). Em *Drosophila* pela primeira vez foi comprovado que o silenciamento de genes localizados na periferia nuclear (a heterocromatina) ocorre pela interação destes com a lamina nuclear (Pickersgill, et al., 2006). Também em leveduras foi demonstrado que genes ativos inseridos em regiões adjacentes aos telômeros, que se localizam na periferia nuclear, são reprimidos devido a sua interação com proteínas do envelope nuclear (revisado em Kalverda, et al., 2008).

Figura 1.5: Organização nuclear dos cromossomos e genes. Cada cromossomo ocupa um território cromossômico (em laranja, azul, verde e preto/vermelho). O espaço entre os territórios é denominado de domínio intercromossomal. O cromossomo representado apresenta em preto os genes replicados ao final da fase S e em vermelho os genes replicados no início da fase S. As setas indicam a disposição destes genes dentro do território cromossômico. Os genes que replicam ao final de S se localizam na periferia nuclear (em preto) e os genes que replicam no início de S se localizam na região central do núcleo (em vermelho). Adaptado de Lamond e Earnshaw, 1998.

O fato dos cromossomos ocuparem territórios dentro do núcleo e que a heterocromatina tende a ocupar a periferia nuclear, pode-se sugerir que estes são rígidos e

estáticos, porém tem-se observado que os cromossomos são dinâmicos, movendo-se dentro do espaço nuclear (Schneider e Grosschedl, 2007). Em leveduras, por exemplo, demonstrou-se que a cromatina se desloca por 0,5µm em poucos segundos (Dundr e Misteli, 2001). A velocidade e distância de movimentação variam entre os diferentes tipos de células e também conforme a fase do seu ciclo (revisado em Chuang e Belmont, 2007). Em células HeLa foi observada alta mobilidade cromossômica durante início de G1 e drástica diminuição desta movimentação ao chegar ao final desta fase (Walter, et al., 2003).

A existência destes movimentos cromossômicos reforça a idéia de que o núcleo é uma estrutura auto-organizada, assim genes inativos na periferia nuclear podem se deslocar para o interior do núcleo a fim de serem transcritos, como o locus de IgH em progenitores de células B que quando inativos estão localizados na periferia nuclear, mas movem-se para o interior nuclear quando sua transcrição é necessária em precursores de células B (Kosak, et al., 2002 e Ragoczy, et al., 2006).

1.3 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da Doença de Chagas, descoberto por Carlos Chagas em 1909 (Chagas, 1909). Durante seu ciclo de vida *T. cruzi* apresenta dois tipos de hospedeiros, o vetor invertebrado pertencente à família Triatiominae e o hospedeiro vertebrado que inclui diversos mamíferos. Por ser uma espécie muito complexa e ampla, foi dividida em dois grupos distintos denominados *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (revisado em Devera, et al., 2003). *T. cruzi* I está associado ao ciclo de transmissão selvagem e infecção de marsupiais (Clark e Pung, 1994), enquanto *T. cruzi* II, que é constituído por cinco subgrupos, IIa a IIe, está relacionado ao ciclo de transmissão doméstica e infecção de mamíferos (Brisse, et al., 2000).

1.3.1 kDNA e sua replicação

T. cruzi pertence à ordem kinetoplastida, pois possui o cinetoplasto que é o DNA de sua única mitocôndria, também denominado de kDNA. O kDNA tem forma de disco e está conectado ao corpo basal, de onde nasce o flagelo, por meio de filamentos que atravessam a membrana mitocondrial e se ligam a ele. O kDNA é composto por algumas dezenas de maxicírculos e milhares de minicírculos que estão concatenados formando uma rede que é

estabilizada por pelo menos quatro tipos de proteínas semelhantes às histonas, denominadas de KAP (*kinetoplast associated protein*). Estas compactam os mini e maxi-círculos dando a forma de disco ao cinetoplasto (revisado em Liu, et al., 2005).

A perda de um mini-círculo essencial pode ser letal para a célula-filha, assim a replicação fiel e a segregação correta devem ocorrer. Durante a fase S do núcleo os mini-círculos são liberados da rede do kDNA por meio de uma topoisomerase II e alcançam a região entre o cinetoplasto e o corpo basal, chamada de zona cinetoflagelar, desta forma cada mini-círculo será replicado individualmente. Primeiramente a proteína UMSBP (*universal minicircle-sequence-binding protein*) se liga à origem de replicação denominada CSB3 e inicia o processo de replicação. As DNA polimerases mitocondriais IB e IC são as reponsáveis pelo alongamento das fitas de DNA, que juntamente com UMSBP estão localizadas em uma subregião da zona cinetoflagelar denominada centro cinetoflagelar. Há portanto a formação da forquilha de replicação, surgindo as formas θ intermediárias de mini-círculo. A fita contínua é sintetizada a partir de um *primer* de RNA produzido pela RNA polimerase mitocondrial (mt RNA polimerase), enquanto a fita descontínua, formada por vários fragmentos de Okazaki, é sintetizada a partir de vários *primers* de RNA produzidos pela DNA primase (Liu, et al., 2005 e Lukeš, et al., 2005).

Após a duplicação de todos os mini-círculos, estes migram da zona cinetoflagelar para os sítios antipodais, que se encontram ao lado do cinetoplasto a 180° um do outro. Neste sítio estão presentes as proteínas envolvidas no processo de união dos fragmentos da fita descontínua e a topoisomerase II. Assim as proteínas SSE1 (*structure-specific endonuclease I*), ribonuclease H, DNA polimerase β e DNA polimerase β -PAK irão remover dos *primers* e preencher os espaços entre os fragmentos, enquanto as DNA ligases mitocondriais $\kappa\beta$ irão promover a ligação destes fragmentos. Os mini-círculo recém-sintetizados devem apresentar pelo menos um *gap*, assim são recolocados na rede de kDNA pela topoisomerase II concatenado com cerca de três mini-círculos (Figura 1.6) (Liu, et al., 2005 e Lukeš, et al., 2005).

A replicação dos maxi-círculos ainda é pouco conhecida, assim como os mini-círculos parece ter apenas uma origem de replicação e formam estruturas intermediárias θ , mas ao contrário dos mini-círculo permanecem ligados à rede de kDNA (Liu, et al., 2005 e Lukeš, et al., 2005).

Figura 1.6: Estruturas do cinetoplasto e localização das proteínas envolvidas na replicação do kDNA. Cinetoplasto tem forma de disco e se localiza no interior da mitocôndria próximo ao corpo basal. Círculo verde abaixo do cinetoplasto é o centro cinetoflagelar onde estão localizadas as DNA polimerases IC e IB e a proteína UMSBP. Os filamentos presentes na zona cinetoflagelar (KFZ – *Kinetoflagelar zone*) conectam o cinetoplasto ao corpo basal, nesta região estão os mini-círculos livres e a forma intermediária θ . Círculos em rosa são os sítios antipodais onde estão localizadas diversas proteínas que processam os minicírculos replicados. Retirado de Liu et al, 2005.

1.3.2 Ciclo de Vida

O *T. cruzi* apresenta formas variadas durante o seu ciclo de vida que apresentam diferenças morfológicas, bioquímicas e fisiológicas. As formas amastigota (presentes no hospedeiro mamífero) e epimastigota (presente no hospedeiro barbeiro) apresentam uma alta atividade transcricional, replicam-se, mas não são capazes de infectar células. As formas tripomastigota (em mamíferos) ou tripomastigota metacíclica (em barbeiros) apresentam uma baixa atividade transcricional, não são capazes de se dividir, mas são altamente infectivas (De Souza, 1984 e Elias, et al., 2001).

Figura 1.7: Diferentes formas de *T. cruzi* durante seu ciclo de vida. Epimastigotas e amastigotas que são proliferativas e não infectivas e tripomastigotas que são infectivas e não proliferativa. Retitado de Elias, et al., 2001.

Durante o repasto sangüíneo o inseto vetor (barbeiro) infectado defeca liberando as formas tripomastigotas metacíclicas (Figura 1.8: a), que possuem forma fina e alongada com núcleo também alongado e cinetoplasto posterior a ele (Figura 1.7). Estes parasitas infectam o hospedeiro mamífero por meio de lesões na pele (Figura 1.8: b), da mucosa ocular ou até mesmo por via oral através da ingestão de alimentos contaminados. O tripomastigota metacíclico é capaz de infectar diversos tipos celulares. Ao interagir com a membrana celular é fagocitado, encontrando-se no interior do vacúolo-parasitófago. O parasita pode escapar deste vacúolo e alcançar o citoplasma da célula onde irá se diferenciar em amastigota (Figura 1.8:c), que possui forma arredondada com núcleo também arredondado e flagelo curto (Figura 1.7). Através de diversas fissões binárias os amastigotas se multiplicam dentro da célula e então se diferenciam em tripomastigotas. Neste momento ocorre a ruptura da célula (Figura 1.8: d) e os tripomastigotas são liberados podendo: infectar outras células e repetir o ciclo (Figura 1.8: e), atingir a circulação sanguínea (Figura 1.8: f) ou ainda infectar células do músculo ou tecido nervoso e formar os ninhos de amastigota (Figura 1.8:g).

Figura 1.8: Representação esquemática do ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Em (a) deposição de tripomastigota metacíclico; (b) metacíclicos infectam hospedeiro vertebrado; (c) invasão celular e multiplicação de amastigotas; (d) ruptura da célula e liberação de tripomastigotas para (e) invadir outras células, (f) atingir corrente sanguínea ou (g) formar ninhos de amastigotas. Em (h) vetor ingere tripomastigotas que (i) se diferenciam em epimastigotas que se multiplicam, diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos e são (a) liberados nas fezes. Retirado de Macedo, et al., 2002.

Os tripomastigotas presentes na circulação sanguínea podem ser ingeridos pelo vetor barbeiro durante o repasto sanguíneo e então se transformam em epimastigotas (Figura 1.8:i), que são alongados, com núcleo arredondado e cinetoplasto anterior a ele (Figura 1.7). Estes se multiplicam no intestino do vetor invertebrado e após migrarem para o intestino posterior, aderem ao epitélio e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos que são liberados nas fezes (Figura 1.8: a) fechando o ciclo (Tyler e Engman, 2001 e De Souza, 2002).

1.3.3 Epimastigota

Para o estudo da replicação em *T. cruzi* a forma epimastigota tem sido utilizada pelo laboratório. Em 2007 Elias e cols. caracterizaram as modificações morfológicas que ocorrem com epimastigotas durante o seu ciclo celular, de forma que é possível identificar as diferentes fases do ciclo em uma cultura exponencial (Figura 1.9).

Figura 1.9: Representação esquemática das modificações morfológicas durante o ciclo celular da forma epimastigota de *T. cruzi*. As fases do ciclo celular estão indicadas por G1, S (síntese), G2, M (mitose) e C (citocinese). O ciclo de 24h está dividido conforme o tempo de cada fase no centro do esquema. F=flagelo, K=cinetoplasto e Fp=bolsa flagelar. Os núcleos em preto possuem o dobro de DNA dos em cinza. Retirado de Elias et al, 2007.

Esta identificação é feita através do número de cinetoplasto (K), núcleo (N) e flagelo (F). Células que estão nas fases G1 e S do ciclo celular possuem 1N1K1F, ao final da síntese do DNA a célula entra na fase G2 e nesta fase um novo flagelo surge, assim tem-se 1N1K2F. Durante a mitose ocorre a segregação dos cinetoplastos, de forma que nesta fase se tem 1N2K2F. Finalmente na citocinese o núcleo se divide apresentando 2N2K2F (Figura 1.10) (Elias, et al., 2007).

G1/S	1N 1K 1F	
G2	1N 1K 2F	
M	1N 2K 2F	
C	2N 2K 2F	

Figura 1.10: Características morfológicas de epimastigota durante seu ciclo celular. O número de núcleo (N), cinetoplasto (K) e flagelo (F) indicam a fase do ciclo celular de epimastigota. Núcleo em azul, cinetoplasto em laranja e flagelo em vermelho.

A mitose em epimastigota, e também em amastigota, é fechada, ou seja, a carioteca permanece intacta durante todo o ciclo celular não se rompendo durante a mitose como ocorre na maioria dos eucariotos (De Souza e Osmani, 2007).

1.3.4 Organização Nuclear

Os tripanosomatídeos apresentam muitas características peculiares, diferindo dos demais eucariotos em processos nucleares importantes como a transcrição e a própria compactação do DNA, que resulta em uma organização nuclear diferente da maioria dos eucariotos.

a) Organização Espaço-Temporal

A transcrição em *T.cruzi* dos mRNAs é policistrônica. A RNA polimerase II parece não possuir sítios promotores de forma que os diferentes genes são transcritos em um longo e único RNA. Assim para que mRNA maduros e independentes sejam formados, o RNA policistrônico deve sofrer trans-splicing, que adiciona uma sequência líder na sua extremidade 5', e poliadenilação na extremidade 3'. Ao final deste processo mRNAs maduros individuais se formam (Palenchar e Bellofatto, 2006).

A organização deste processo no interior nuclear de *T. cruzi* é diferente dos demais eucariotos, enquanto nestes últimos são encontrados diversos pontos de transcrição (sítios de transcrição) espalhados por todo o núcleo (Cook, 1999), em *T.cruzi* a transcrição ocorre na região central do núcleo, não sendo encontrado pontos individualizados de transcrição de mRNA, apenas a transcrição da sequência líder ocorre em um ponto definido próximo ao nucléolo (Dossin e Schenkman, 2005).

A replicação neste organismo também se apresenta organizada diferente dos eucariotos que possuem diversos sítios de replicação distribuídos no interior nuclear (Cook, 1999). Assim a replicação da forma epimastigota de *T. cruzi* ocorre apenas na periferia nuclear que é a única região onde é observada a incorporação de Bromodeoxiuridina, e é onde os seus cromossomos estão localizados. Portanto, os cromossomos que durante a fase G1 se encontravam dispersos pelo núcleo migram para a periferia nuclear durante a fase S para que possam ser duplicados, permanecendo nesta região até o final da mitose (Figura 1.11) (Elias, et al., 2002).

Figura 1.11: Modelo da dinâmica dos cromossomos durante ciclo celular de *T. cruzi* – epimastigota. Em G1 os cromossomos estão dispersos pelo núcleo. Nas demais fases (S, G2, M) os cromossomos estão localizados na periferia nuclear. Nucléolo está no centro do núcleo. Retirado de Elias et al, 2002.

b) Organização da Cromatina

A compactação do DNA formando a cromatina em *T. cruzi* é igual a dos demais eucariotos, havendo a presença do octâmero formado por duas de cada histona H2A, H2B, H3 e H4. Porém a sequência das histonas de *T. cruzi* é diferente, especialmente da histona H1 que não possui a região globular. Assim, a falta desta região contribui para a limitação da compactação da cromatina, que não forma fibras 30 nm e então não forma os cromossomos altamente compactados durante a mitose (Solari, 1980).

c) Organização Espacial dos Cromossomos e Cromatina

Nada se sabe sobre a distribuição dos cromossomos no espaço nuclear formando territórios cromossômicos em *T. cruzi*, mesmo porque é difícil determinar o número de cromossomos deste organismo já que durante a mitose não ocorre a condensação máxima destes (Solari, 1980). Porém sabe-se que os cromossomos de *T. cruzi* se movimentam no espaço nuclear durante o ciclo celular de epimastigota (Figura 1.11) podendo estar disperso durante a fase G1, ou então concentrado na periferia nuclear durante as fases S, G2 e mitose (Elias, et al., 2002). Também se sabe que a disposição da heterocromatina durante o ciclo de vida de *T. cruzi* varia, assim as formas replicativas (epimastigota e amastigota) que possuem alta atividade transcricional apresentam a heterocromatina na periferia nuclear, enquanto a

forma não replicativa (tripomastigota) possuem baixa atividade transcricional e muita heterocromatina distribuída por todo o núcleo (Elias, et al., 2001).

1.3.5 Replicação

O estudo da replicação da forma epimastigota de *T. cruzi* em nosso laboratório está esclarecendo como se forma a maquinaria de pré-replicação. Diferente de levedura e demais eucariotos, *T. cruzi* não possui as seis subunidades de ORC₁₋₆ e nem Cdc6, mas sim uma proteína semelhante tanto à Orc1 quanto a Cdc6, anotado no banco de dados como Orc1 e que foi por nós denominada TcOrc/Cdc6. *T. cruzi* também não apresenta a proteína Cdt1, mas possui as seis proteínas que compõem o hexâmero MCM₂₋₇ (Figura 1.11). Assim se acredita que o complexo de pré-replicação em *T. cruzi* seria formado por TcOrc/Cdc6, que reconhece a origem de pré-replicação, e pelo complexo MCM₂₋₇. Mas o modo como ocorre o recrutamento deste último ainda não está esclarecido (Figura 1.12:B).

Figura 1.12: Formação do complexo de pré-replicação em eucariotos e trypanosomas. (A) Em eucariotos um complexo formado por seis subunidades ORC 1-6, representado em laranja, se liga à origem de replicação, recruta Cdc6 e Cdt1 que permitem a ligação do complexo MCM 2-7 para formar o complexo de pré-replicação. (B) Modelo sugerido de formação do complexo de pré-replicação em trypanosomas onde Orc/Cdc6 se liga à origem de replicação e então recruta o complexo MCM 2-7.

As proteínas que compõem a maquinaria de replicação de *T. cruzi* não estão definidas, mas por meio de buscas no banco de dados do genoma de *T. cruzi*

(<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tcal/>) para diversas proteínas já identificadas em eucariotos foi possível constatar a presença de genes para várias destas proteínas tais como várias DNA polimerases, DNA ligases, FEN1, PCNA e as cinco subunidades de RFC.

A proteína PCNA é muito conservada entre os eucariotos, apresentando homólogos em archaea, bactérias e vírus (Figura 1.13) (Indiani e O'Donnel, 2006). Assim por ser altamente conservado e não apresentar atividade enzimática, PCNA tem sido utilizado como marcador da maquinaria de replicação em estudos de diferentes sistemas como: mamíferos (Cook, 1999), *Drosophila* (Easwaran, et al. 2007), hamster (Dimitrova e Berezney, 2002) e protozoários ciliados (Postberg, et al. 2005).

Figura 1.13: Estrutura quaternária de PCNA de diferentes organismos. Cada monômero está representado por uma cor diferente. Em (A) homólogo de PCNA em bactéria (subunidade β da DNA polimerase), (B) homólogo de PCNA em vírus (gp45), (C) PCNA de levedura e (D) de archaea. Retirado de Indiani e O'Donnel, 2006.

2 OBJETIVOS

Estabelecer a dinâmica da maquinaria de pré-replicação e replicação do DNA durante o ciclo celular da forma proliferativa de *Trypanosoma cruzi*, utilizando TcOrc/Cdc6 como marcador da maquinaria de pré-replicação e TcPCNA como marcador da maquinaria de replicação.

2.1 Objetivos Específicos

- Obter anticorpo policlonal anti-TcPCNA.
- Identificar os padrões de localização de TcOrc/Cdc6 e TcPCNA no núcleo de epimastigota.
- Relacionar os padrões de TcOrc/Cdc6 e TcPCNA com as fases do ciclo celular de epimastigota de cultura exponencial.
- Confirmar a localização dos sítios de replicação no espaço nuclear.
- Analisar os padrões nucleares de TcOrc/Cdc6 e TcPCNA, em ensaio de dupla marcação, nas diferentes fases do ciclo celular de epimastigota de cultura exponencial.

3 Material e Métodos

3.1 Cultura de Células

A cepa Y de *Trypanosoma cruzi*–epimastigota foi mantida em meio LIT, suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 28 °C (Camargo, 1964). Epimastigotas transfectados com pTEX-delta contendo a seqüência decodificadora para GFP (*green fluorescence protein*) em fusão com a seqüência correspondente a porção dos aminoácidos 4-28 do gene H2B de *T. cruzi*, foram mantidos como descrito acima, mas na presença de 500µg de geneticina G418 por mL (Elias, et al., 2001).

3.2 Clonagem de TcPCNA em vetor de expressão

O vetor TOPO-TcPCNA, disponível no laboratório, foi digerido com a enzima de restrição *Nhe* I e o TcPCNA foi então subclonado no vetor pET 28a (Novagen) já linearizado com a mesma enzima.

3.3 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado utilizando o kit de sequenciamento *Big Dye Terminator v3.1* (Applied Biosystems) utilizando 150 ng de DNA e 1,6 pmol de *primer* seguindo instruções do fabricante. Para corrida foi utilizado o seqüenciador *3100 Genetic Analyzer* da Applied Biosystems.

3.4 Expressão de TcPCNA recombinante

O vetor pET28a-TcPCNA foi transformado em bactéria de expressão *Escherichia coli* BL21. Para pré-inóculo foram crescidos *overnight* 25 mL de bactéria de expressão em LB, contendo 0,04 mg/mL de kanamicina como antibiótico de seleção, a 37 °C sob agitação de 180 rpm. Este pré-inóculo foi expandido para 250 mL e crescido por 2 horas e 30 minutos e então induzido com 1 mM de IPTG por 3 horas.

Depois de centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos (*eppendorf-centrifuge 5810 R*) o *pellet* de bactérias foi ressuspendido em 20 mL de PBS contendo inibidores de protease (*complete Mini, EDTA-free* - Roche), e então adicionado 200 µg de lysosima (de ovo branco

de galinha – Boehringer Mannheim) para lise. Estas bactérias foram mantidas sob agitação em gelo por 30 minutos, e depois sonicado seis vezes por 15 segundos com intervalos de 1 minuto. O lisado foi centrifugado a 26000 g por 10 minutos (*eppendorf-centrifuge 5810 R*).

3.5 Purificação de rTcPCNA

O corpúsculo de inclusão formado depois da lise foi ressuspenso em uréia 8 M, 50 mM de tris pH 8 e 100 mM de NaCl. A purificação da proteína recombinante foi feita em coluna de níquel pela qual a calda de histidina presente na TcPCNA recombinante (rTcPCNA) tem afinidade. Depois da associação da rTcPCNA ao níquel, a coluna foi lavada com 10 volumes (V) de tampão de lavagem pH7 (uréia 8 M, 50 mM de tris, 100 mM de NaCl) e depois lavado novamente com 10 V do mesmo tampão pH 6 e eluído com 3 V deste tampão pH 4 (1 V corresponde à quantidade em mL de resina na coluna).

3.6 Análise da proteína purificada

Para análise da proteína purificada, géis de SDS-PAGE foram realizados. Os géis de separação consistem de Tris-HCl, pH 8,8, SDS (dodecil sulfato de sódio), acrilamida, persulfato de amônio e TEMED (N,N,N,N tetrametiletilenodiamina), segundo Laemmli, 1970. As corridas foram feitas à temperatura ambiente a 200 V. Após a corrida do gel, a coloração foi feita com Coomassie Brilliant Blue (R-250).

3.7 Obtenção de Anticorpos policlonais

Para a obtenção de anticorpos policlonais contra TcPCNA foram utilizados camundongos fêmeas (swiss) e coelhas fêmeas (Branca Nova Zelândia). O rTcPCNA purificado foi dialisado contra PBS *overnight* a 4 °C e utilizado nas imunizações. A imunização em coelho foi a seguinte: na primeira dose foram utilizados 500 µg de rTcPCNA juntamente com adjuvante de Freund's completo, as outras duas doses utilizaram 200 µg de rTcPCNA e adjuvante de Freund's incompleto, todas as doses foram realizadas com intervalos de 3 semanas. A sangria foi feita 10 dias após a terceira dose. A imunização em camundongo foi feita da seguinte forma: na primeira dose foi utilizado 100 µg de rTcPCNA e adjuvante completo de Freund's e as duas demais doses utilizaram 100 µg juntamente com adjuvante incompleto de Freund's. A sangria foi feita 10 dias após a terceira dose. O sangue

foi colocado a 37 °C por 1 hora para coagulação. A amostra e em seguida colocado a 4°C *overnight* para retração do coágulo que foi então centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos e o soro foi recolhido e armazenado a 4°C.

3.8 Purificação de anticorpo

Para purificação dos anticorpos policlonais foram utilizadas colunas de níquel fixadas com rTcPCNA da seguinte maneira: primeiramente a coluna foi equilibrada com 5 V de tampão de equilíbrio (uréia 8 M, NaCl 300 mM, fosfato de sódio 20 mM, pH 8), e então TcPCNA recombinante previamente purificado foi passado nesta coluna afim de ligar-se ao níquel. Em seguida a coluna foi submetida a um gradiente de uréia de 6 M, 3 M e 1 M, todos estes tampões contendo também fosfato de sódio 20 mM, NaCl 300 mM, pH 8 . Ao final esta TcPCNA recombinante foi fixada à coluna com formaldeído 1%, e a coluna foi lavada e armazenada em PBS.

O soro total, tanto de coelho como camundongo, foi diluído 1:10 em PBS e então passado na coluna fixada com TcPCNA recombinante por duas vezes. Em seguida a coluna foi lavada com 10 V de PBS, e 5 V de trietanolamina 100 mM pH 7. Para eluição foi utilizado 3 V de trietanolamina 100 mM pH 11, e coletadas em alíquotas de 500 µL.

3.9 Adsorção de anti-TcPCNA em extrato de *E. coli* BL21

Preparação de extrato de BL-21: foram crescidos por 3 horas, a 37 °C sob agitação de 180 rpm, um pré-inóculo de 2 mL em LB que em seguida foi expandido para 80 mL de LB que permaneceu a 37 °C e 180 rpm *overnight*. Destes 80 mL, 40 mL foram autoclavados e os outros 40 mL foram centrifugados (4000 rpm por 10 minutos - *eppendorf* centrifuge 5810 R) e o *pellet* foi ressuscitado em formaldeído 0,5% e deixado sob agitação a 4 °C por 2 horas. Estes dois procedimentos foram realizados a fim de expor diferentes antígenos. Em seguida estes dois foram misturados e centrifugados por 15 minutos a 5000 rpm em temperatura de 4 °C. O *pellet* foi lavado com 40 mL de PBS, centrifugado novamente. Finalmente este *pellet* foi ressuscitado em 40 mL de PBS e armazenado em alíquotas de 1 mL em temperatura de -20 °C. Para adsorção foram utilizados o eluato da purificação de anti-TcPCNA foi adicionado ao *pellet* de extrato de BL-21 que permaneceu sob agitação por duas horas a 4 °C. Foi então centrifugado por 10 minutos a 14 rpm (*eppendorf* – centrifuge 5415 D) em temperatura ambiente e o sobrenadante foi adicionadoa outro *pellet* de BL-21 (obtido através da

centrifugação do extrato de *E. coli* Bl-21) e colocado sob agitação por duas horas a 4 °C, este processo foi repetido por mais duas vezes. Então o sobrenadante foi recolhido e filtrado em filtro de 0,22 µm.

3.10 Immunoblotting

Extrato total da forma epimastigota de *T. cruzi*, cepa Y (10^7 células /poço) ou 1 µg das proteínas recombinantes obtidas como acima descrito, foram submetidos à SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose. Após bloqueio das membranas com PBS/5% molico, estas foram incubadas com soro pré-imune ou imune (anti-TcPCNA) de coelho ou de camundongo por 1h, diluídos 1:100 em PBS-molico. As membranas foram lavadas por 3X com PBS-molico, 10 minutos cada lavagem, e incubadas com anti-imunoglobulina de coelho ou de camundongo conjugados a peroxidase (KPL) diluído 1:1000 em PBS-molico. Após nova lavagem, as membranas foram reveladas utilizando-se kit de quimioluminescência (Pierce), segundo instruções do fabricante. Outras membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho ou camundongo conjugados a fosfatase alcalina (KPL) diluído 1:1000 em PBS-molico. Após lavagem, as membranas foram reveladas com BCIP/NBT kit (Zymed), segundo instruções do fabricante.

3.11 Imunofluorescência

Epimastigotas de cultura exponencial contendo cerca de 5×10^6 /mL foram lavados 3 vezes com PBS e em seguida colocados para aderir em lâmina, e deixados fixando com paraformaldeído 2% em PBS durante 25 minutos. As células foram lavadas com PBS e depois permeabilizadas com triton X-100 0,1% em PBS por 5 minutos. Em seguida a lâmina foi bloqueada por 30 minutos com PBS/BSA 1%, e incubada por 1 hora com anticorpo primário anti-TcPCNA diluído 1:2, ou anti-TcOrc/Cdc6 diluído 1:200 em PBS/BSA 1%. Foi então lavada por 3 vezes com PBS e incubada por 45 minutos com anticorpo secundário anti-IgG (anti-mouse ou anti-rabbit da KPL conjugado à fluoróforo alexa 488 ou 555) diluído 1:100 e DAPI 0,2 mM em PBS/BSA 1%. Para os ensaios de dupla marcação os anticorpos primários foram incubados separadamente e consecutivamente com lavagem entre as incubações. Os anticorpos secundários foram incubados juntos. Para ensaios de TcOrc/Cdc6 ligada ao DNA foi feita, antes da fixação, extração das proteínas solúveis com tampão CSK-triton (10 mM de Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM PMSF, 50 mM de Fluoreto de Sódio, 1

mM de Ortovanadato de Sódio e 0,1% Triton X-100) durante 10 minutos (Tatsumi et al, 1999). Os parasitas foram fixados e o restante do procedimento foi realizado como descrito acima. As lâminas foram montadas com Vectashield (VECTOR) e analisadas em: Microscópio Nikon 600 em objetiva plana-apocromática 100X/1,4 e as imagens foram adquiridos pela câmera DXM200 acoplada lentes de aumento 2,5X ou em microscópio confocal Zeiss LSM 510.

3.12 Incorporação de Bromodeoxiuridina (BrdU)

Epimastigotas de cultura exponencial foram incubadas com 100µM de bromodeoxiuridina, que é um análogo de timidina, em PBS a 28 °C por 3 horas. Em seguida foram lavadas duas vezes com PBS, e colocadas em lâmina para aderir. Foram então fixadas com metanol gelado por 10 minutos, e depois tratadas com HCl 1,5 N por 30 minutos para desnaturar o DNA, e lavadas com PBS por três vezes. Em seguida as células foram incubadas com 2,5 µg/ml de anti-BrdU (Roche) diluído em PBS/BSA 1% por 45 minutos em temperatura ambiente, lavadas três vezes com PBS e incubadas com 1µg/mL anti-mouse (Alexa 488 – KPL) e 0,2 mM de DAPI em PBS/BSA 1% por 45 minutos em temperatura ambiente. A lâmina foi montada com Vectashield (VECTOR).

3.13 Ensaio de dano ao DNA

Epimastigotas de cultura exponencial contendo cerca de 10^7 parasitas por mL foram colocados em exposição à radiação gama por 2 horas a 500 gray, que gera quebras em fitas dupla de DNA. Foram coletados pontos 0, 24 e 48 horas após a exposição, e feitos extratos totais de proteína da seguinte maneira: os epimastigotas foram lavados uma vez com PBS, ressuspensos em Sample Buffer 1X (62,5 mM Tris-Hcl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol e 0,01% bromofenol azul) e fervido a 95 °C. Estas amostras foram analisadas por meio de *Imunoblotting*.

3.14 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Ensaio de Microscopia Eletrônica foram realizados em colaboração com a Dra. Maria Cristina Motta do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Para imunocitoquímica, epimastigotas foram fixados por 1 hora em tampão de

fixação para imunocitoquímica. O material fixado foi lavado em tampão cacodilato duas vezes e neutralizado com cloreto de amônio 50 mM. Após a desidratação de concentrações crescentes de etanol, parasitas foram infiltrados em resina Unicryl progressivamente a baixas temperaturas. A polimerização ocorreu com cápsulas BEEM a -20 °C sob luz ultravioleta durante três dias. Cortes ultrafinos foram coletados em grades de níquel 400-*mesh* e neutralizados com cloreto de amônio 50mM em PBS por 30 minutos. As grades foram bloqueadas por 30 minutos em solução de bloqueio. Os cortes foram então incubados com anti-TcPCNA por 1 hora. Após 3 lavagens em PBS foi feita incubação por 45 minutos com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a partículas de ouro de 10nm (Biolabs) na diluição de 1:250. Lavou-se novamente em PBS e água destilada. As grades foram marcadas com acetato de uranila e citrato e observadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss 900.

4 RESULTADOS

Para análise da dinâmica dos fatores envolvidos na replicação durante o ciclo celular de epimastigota, nós utilizamos dois marcadores: TcOrc/Cdc6 e TcPCNA. TcOrc/Cdc6 foi utilizado como marcador da maquinaria de pré-replicação. Esta proteína é a primeira a se ligar ao DNA para que o complexo de pré-replicação seja formado na transição das fases mitose/G1. O anticorpo contra essa proteína já está disponível no laboratório. PCNA, que já tem sido usado como marcador da maquinaria de replicação em vários sistemas por ser altamente conservado e não possuir atividade enzimática (Dimitrova e Berezney, 2002 e Postberg, et al, 2005), foi utilizado como marcador da maquinaria de replicação em *Trypanosoma cruzi*.

Primeiramente serão descritos os resultados obtidos da maquinaria de pré-replicação (TcOrc/Cdc6) e em seguida será descrito o processo de obtenção do anticorpo policlonal anti-TcPCNA e os resultados dos ensaios utilizando este marcador da maquinaria de replicação.

4.1 Padrões de TcOrc/Cdc6 em núcleo de epimastigota

Epimastigotas de cultura exponencial foram fixados em lâmina e incubados com anti-TcOrc/Cdc6 em ensaio de imunofluorescência. TcOrc/Cdc6 foi encontrado sob dois padrões no núcleo de epimastigota que foram denominados de disperso e periférico (Figura 4.1). No padrão disperso (que representa 40,5% das células contendo 1N1K1F), TcOrc/Cdc6 está distribuído por todo o núcleo, excluindo apenas a região do nucléolo, como mostra a figura 4.1: A. Já no padrão periférico (59,5% das células contendo 1N1K1F) TcOrc/Cdc6 está restrito à periferia nuclear como mostra a figura 4.1: B. Em microscópio confocal foram feitas séries-Z (imagens em diferentes planos focais de uma mesma célula) dos dois padrões de TcOrc/Cdc6, a fim de avaliarmos estes padrões no espaço nuclear. A série-Z de TcOrc/Cdc6 disperso está apresentada na figura 4.2: A. É possível ver que nos três diferentes focos do núcleo de epimastigota TcOrc/Cdc6 é encontrado disperso, excluindo apenas uma pequena região interna, que possivelmente é o nucléolo. A série-Z do padrão periférico de TcOrc/Cdc6 está mostrada na figura 4.2: B, onde é possível observar que TcOrc/Cdc6 se encontra, nos três planos focais, na periferia nuclear de epimastigota.

A fim de avaliarmos os padrões de localização de TcOrc/Cdc6 em relação ao nucléolo, utilizamos epimastigotas pTEX-delta, que são epimastigotas transfectados com vetor pTEX

contendo a sequência da região N-terminal da histona H2B fusionada à GFP e que de um modo desconhecido marca apenas o nucléolo. Na figura 4.3: A, que apresenta o padrão disperso de TcOrc/Cdc6, vemos que TcOrc/Cdc6 ocupa todo o núcleo excluindo apenas o nucléolo, marcado em verde. Diferentemente o padrão periférico, mostrado na figura 4.3: B, não marca o centro do núcleo, excluindo uma área central do núcleo maior que o nucléolo.

4.2 Padrões de TcOrc/Cdc6 durante ciclo celular de epimastigota

Sabendo que TcOrc/Cdc6 pode ser encontrado em dois padrões diferentes no núcleo, cultura exponencial deste parasita foi fixada em lâmina e incubada com anti-TcOrc/Cdc6 para analisar como seus padrões estão distribuídos nas diferentes fases do ciclo celular.

Como pode ser visto na figura 4.4, o padrão disperso é encontrado em todas as fases do ciclo celular, enquanto o padrão periférico é encontrado apenas em G1/S. Esta figura apresenta epimastigota em G1/S, com 1N1K1F, apresentando padrão disperso e padrão periférico. Também pode ser visto o padrão disperso de TcOrc/Cdc6 nas fases G2, M (mitose) e C (citocinese).

4.3 TcOrc/Cdc6 permanece ligado ao DNA durante ciclo celular de epimastigota

A formação do complexo de pré-replicação ocorre ao final da mitose e início de G1, quando todas as proteínas do complexo se encontram ligadas ao DNA (Bell e Dutta, 2002). Para avaliar em que momento do ciclo celular de epimastigota TcOrc/Cdc6 se encontra ligado ao DNA, imunofluorescência com prévia extração das proteínas solúveis com o tampão CSK-triton foi realizado utilizando anti-TcOrc/Cdc6. A figura 4.5 mostra que após extração, TcOrc/Cdc6 permanece ligado ao DNA. E na figura 4.6 é possível observar que TcOrc/Cdc6 está ligado ao DNA em todas as fases do ciclo celular após extração das proteínas solúveis.

4.4 Obtenção de TcPCNA Recombinante

Para obtenção de anticorpo anti-TcPCNA primeiro obtivemos a proteína recombinante para posterior imunização em coelho e camundongo.

O vetor TOPO-TcPCNA já disponível em nosso laboratório foi sequenciado para confirmar a sequência clonada (dados não mostrados). Então foi digerido com a enzima *Nhe* I e o fragmento formado de cerca de 870 bp, correspondente ao TcPCNA, foi subclonado no

vetor de expressão pET28a. A construção pET28a-TcPCNA foi então digerida com a enzima de restrição *Nhe* I, para confirmação da inserção de TcPCNA em pET28a, que liberou o fragmento no tamanho esperado de cerca de 870bp como mostra a figura 4.7:A.

Este vetor foi transformado em bactéria de expressão *E.coli* BL-21 e induzido com 1mM de IPTG por 3 horas, como mostra o esquema na figura 4.7: B, que expressou uma proteína entre 34 e 49 kDa (seta figura 4.1: C) dentro da massa esperada de 37 kDa (~32 KDa de TcPCNA e ~5 kDa da calda de histidina). Após a expressão, as bactérias foram lisadas e a proteína recombinante permaneceu insolúvel no corpúsculo de inclusão. Este foi ressolubilizado em uréia 8M e submetido à coluna de níquel para purificação por cromatografia de afinidade. A figura 4.7: D mostra o perfil de eluição da proteína recombinante TcPCNA. Estes eluatos foram dialisados contra PBS e a proteína recombinante mostrou-se insolúvel precipitando quando em PBS (figura 4.7: E). Após quantificação, TcPCNA recombinante foi utilizado para imunizar coelho e camundongos.

4.5 Anticorpo Policlonal anti-TcPCNA Reconhece Proteína em Extrato Protéico de *T.cruzi* – epimastigota

Após imunizações os soros de coelho e camundongo foram ensaiados por *immunoblotting* contra proteína recombinante e reconheceu tanto a proteína recombinante como algumas proteínas contaminantes presentes no eluato usado nas imunizações (Figura 4.8: A). Quando estes soros foram ensaiados por *immunoblotting* contra extrato total de proteínas de *T.cruzi* epimastigota reconheceram uma banda com massa próxima ao marcador de 34k Da dentro da massa esperada de aproximadamente 32 kDa de TcPCNA (Figura 4.8: B). Estes resultados mostram que o anti-TcPCNA reconhece uma proteína de massa esperada.

Estes soros foram purificados em coluna de níquel pré-fixada com TcPCNA recombinante como mostra a figura 4.9 (soro anti-TcPCNA de coelho), onde os eluatos reconhecem apenas a banda esperada. O anti-TcPCNA purificado foi também adsorvido contra extrato de *E. coli* BL-21 para diminuição de marcações inespecíficas observadas em testes de imunofluorescência.

4.6 Anti-TcPCNA Reconhece Proteína Nuclear e Funcional

O anti-TcPCNA (coelho) foi analisado em epimastigotas por microscopia eletrônica de transmissão (Figuras 4.10: A menor aumento e 4.10: B maior aumento) e se observou que

a marcação de TcPCNA se restringe apenas ao núcleo, como o esperado já que as suas funções estão envolvidas em processos diretamente ligados ao DNA como reparo e a própria replicação (Moldovan ,et al., 2007).

Para comprovarmos o papel de TcPCNA no reparo de DNA, como descrito nos demais eucariontes (Modolvan,et al., 2007), epimastigotas foram expostos à radiação gama com o objetivo de causar dano ao DNA (quebra de dupla fita) a fim de verificar o comportamento do TcPCNA. Como mostra a figura 4.11, visivelmente nota-se que a expressão de TcPCNA logo após a irradiação (0h) aumenta em relação ao controle. Em 24h a expressão de TcPCNA aumenta mais, diminuindo após 48h de irradiação. Estes dados apontam para uma possível ação do TcPCNA no reparo já que estas células irradiadas param de replicar após exposição à radiação gama, voltando a replicar 48h depois. Possivelmente TcPCNA participe do processo de reparo do DNA danificado, explicando o aumento de sua expressão em 0h e 24h.

Estes resultados da microscopia eletrônica e de dano ao DNA em *T.cruzi* (epimastigota) evidenciam que o TcPCNA é uma proteína funcional, envolvida em processos do núcleo celular que pode incluir replicação do material genético e reparo de danos ao DNA, assim como nos demais organismos. Estes dados fundamentam a utilização de TcPCNA como marcador de sítios de replicação no *T.cruzi*.

4.7 Padrões de TcPCNA no núcleo de *T. cruzi* em ensaios de imunofluorescência

O anticorpo contra TcPCNA foi utilizado para ensaios de imunofluorescência. Após análise em microscopia confocal, constatou-se dois padrões de localização de TcPCNA no núcleo de epimastigota que foram denominados de disperso e periférico. No padrão disperso (65% das células contendo 1N1K1F), TcPCNA está distribuído por todo o núcleo (Figura 4.12: A), enquanto do padrão periférico (35% das células contendo 1N1K1F)) TcPCNA está localizado apenas na periferia nuclear (Figura 4.12: B).

Em microscópio confocal foram feitas séries-Z dos padrões de TcPCNA. Na figura 4.13: A está a série-Z do padrão disperso. É possível ver que TcPCNA está espalhado por todo o núcleo nos três planos focais, excluindo apenas a região do nucléolo. Na figura 4.13:B está o padrão periférico de TcPCNA, que se restringe à periferia nuclear. Novamente, a fim de caracterizar a localização de TcPCNA em relação ao nucléolo, foi realizada imunofluorescência de TcPCNA em epimastigota que apresenta nucléolo fluorescente. Como mostra a figura 4.14: A, TcPCNA está disperso pelo núcleo, não marcando apenas a região do

nucléolo. Na figura 4.14:B, TcPCNA se concentra na periferia nuclear e não marca o centro do núcleo, excluindo uma área central do núcleo maior que o nucléolo.

4.8 Padrões de TcPCNA durante ciclo celular de epimastigota

Sabendo então que TcPCNA possui dois padrões diferentes no núcleo, fomos entender em que fases do ciclo celular de epimastigotas estes padrões são encontrados. Assim lâminas de imunofluorescência foram feitas com cultura exponencial de epimastigotas e as diferentes fases do ciclo celular foram identificadas conforme o número de núcleo (N), cinetoplasto (K) e flagelo (F) de cada célula (Elias, et al., 2007). Na figura 4.15 todas as fases do ciclo celular estão presentes e vemos que o padrão disperso de TcPCNA é encontrado em todas as fases do ciclo celular, enquanto o padrão periférico é visto apenas na fase G1/S. Assim na fase G1/S, onde o parasita possui 1N1K1F, TcPCNA está disperso ou na periferia nuclear e nas fases G2 (1N1K2F), M (1K2N2F) e C (2N2K2F) apenas o padrão disperso é encontrado.

4.9 Incorporação de Bromodeoxiuridina ocorre na periferia nuclear

Para confirmar o dado já publicado onde a duplicação do DNA ocorre na periferia nuclear de epimastigota (Elias, et al., 2002), ensaio de incorporação de Bromodeoxiuridina (BrdU), que é um análogo de timidina, foi feito em cultura exponencial de epimastigotas. A incorporação foi feita durante 3 horas, pois em tempos menores de incubação não foi possível identificar regiões de incorporação.

Após a incubação as células foram fixadas em lâminas e incubadas com anti-BrdU. A figura 4.16 mostra que as células marcadas, que estão na fase S do ciclo celular, apresentaram incorporação apenas na periferia nuclear, diferente de mamíferos que possuem diversos pontos de incorporação espalhados pelo núcleo (Cook, 2002).

4.10 Dinâmica da maquinaria de pré-replicação e replicação durante as fases G1/S de epimastigota

Sabendo que tanto TcOrc/Cdc6 quanto TcPCNA podem estar concentrados na periferia nuclear ou então dispersos, foi feito ensaio dupla marcação em imunofluorescência a fim de observar os diferentes padrões de TcPCNA e TcOrc/Cdc6 em um mesmo núcleo. A figura 4.17 mostra as três combinações dos dois padrões de TcPCNA e TcOrc/Cdc6 no núcleo

de epimastigotas em G1/S. Encontramos células onde TcPCNA e TcOrc/Cdc6 estão dispersos pelo núcleo, células onde TcPCNA permanece disperso pelo núcleo enquanto TcOrc/Cdc6 é localizado na periferia nuclear e finalmente células onde as moléculas se localizam na periferia nuclear. Estes padrões foram quantificados e estão representados na figura 4.21.

Foram feitas séries-Z destas três combinações de TcPCNA e TcOrc/Cdc6. Assim na figura 4.18, TcPCNA e TcOrc/Cdc6 se encontram dispersos pelo núcleo nos três diferentes planos focais. Já na figura 4.19, TcPCNA está disperso pelo núcleo nos três planos focais, e TcOrc/Cdc6 na periferia nuclear. E na figura 4.20, ambos estão localizados na periferia nuclear nos diferentes planos focais. Na figura 4.21 pode ser vista os padrões de TcOrc/Cdc6 e TcPCNA em maior aumento.

Figura 4.1: Dois padrões de TcOrc/Cdc6 no núcleo de epimastigota. Em (A) padrão disperso de TcOrc/Cdc6 e em (B) padrão periférico de TcOrc/Cdc6. TcOrc/Cdc6 em verde e DAPI em azul. K=cinetoplasto, N=núcleo e barra=2 μ m. Microscopia confocal.

Figura 4.2: Série-Z de microscopia confocal dos padrões de TcOrc/Cdc6. Em (A) série-Z do padrão disperso de TcOrc/Cdc6, em (B) padrão periférico de TcOrc/Cdc6. TcOrc/Cdc6 em verde e DAPI em azul. K=cinetoplasto, N= núcleo e as barras indicam 2µm. Microscopia confocal. A distância entre os planos focais é de 1µm.

Figura 4.3: Padrões de TcOrc/Cdc6 encontrado em núcleo de epimastigota. Em (A) padrão disperso de TcOrc/Cdc6 no núcleo, em (B) padrão periférico de TcOrc/Cdc6. TcOrc/Cdc6 em vermelho, nucléolo em verde e DAPI em azul. K=cinetoplasto, N=núcleo e as barras indicam 2 μ m. Microscopia confocal.

Figura 4.4 Padrões de TcOrc/Cdc6 no núcleo de epimastigota durante o ciclo celular. Epimastigota em G1/S TcOrc/Cdc6 disperso pelo núcleo e TcOrc/Cdc6 localizado na periferia nuclear durante G1/S; epimastigota em G2 com padrão disperso de TcOrc/cdc6; epimastigota em Mitose com TcOrc/Cdc6 disperso e em citocinese com padrão disperso de TcOrc/Cdc6. TcOrc/Cdc6 em verde, flagelo em vermelho e DAPI em azul. N=núcleo, K=kinatoplasto, F=flagelo. Barra= 2 μ m, setas indicam flagelo nascentes. Microscopia de fluorescência.

Figura 5.5: Imunofluorescência de TcOrc/Cdc6 ligada à cromatina. Imunofluorescência com prévia extração de proteínas solúveis. Em **(A)** controle onde há TcOrc/Cdc6 solúvel e ligado ao DNA. Em **(B)** apenas TcOrc/Cdc6 ligado ao DNA. TcOrc/Cdc6 em verde e DAPI em azul e flagelo em vermelho. Barras indicam 4 μ m.

Figura 4.6: Imunofluorescência de Orc/Cdc6 ligada à cromatina durante ciclo celular. Em **(A)** epimastigota em G1/S, em **(B)** epimastigota em G2 e em **(C)** em citocinese. Em todas as fases Orc/Cdc6 permanece ligada à cromatina. Imunofluorescência com prévia extração de proteínas solúveis. Barras indicam 2 μ m. Orc/Cdc6 em verde, flagelo em vermelho e DAPI em azul. Microscopia de fluorescência.

Figura 4.7: Obtenção do vetor pET28a-TcPCNA e da proteína recombinante TcPCNA. Em (A) estão os géis de agarose 1% das digestões de TOPO-TcPCNA e pET28a-TcPCNA com a enzima de restrição *Nhe* I. Os fragmentos formados estão indicados na figura: TOPO- 3,9 Kb; pET28a- 5,36Kb e TcPCNA-870bp.(B) esquema da indução de TcPCNA recombinante em bactéria de expressão BI-21-TcPCNA utilizando 1mM de IPTG. (C ao E) géis de acrilamida 12% corados com Coomassie Blue. As setas estão indicando TcPCNA recombinante no peso esperado de 37KDa, sendo ~32KDa do TcPCNA e ~5KDa da calda de histidina. (C) Expressão da proteína recombinante TcPCNA em BL-21 pET28a-TcPCNA após indução com IPTG 1mM. (D) Purificação da TcPCNA recombinante em coluna de níquel. O tampão utilizado foi uréia 8M, NaCl 500mM e fosfato de sódio 20mM. A purificação foi obtida por decréscimo de pH destes tampões, sendo pH4 o tampão de eluição da proteína recombinante.(E) A eluição obtida foi dialisada contra PBS *overnight* a 4°C, e a proteína recombinante forma um precipitado como mostra o gel, onde o não há proteína solúvel no sobrenadante.

Figura 4.8: *Imunoblotting para análise de soro anti-TcPCNA de coelho e camundongo.* Em (A) membranas contendo TcPCNA recombinante foram coradas com *ponceau* e incubadas com soro pré-imune (PI) e soro anti-TcPCNA (de camundongo ou coelho) diluído 1:1000 e anti-IgG (KPL) conjugado à fosfatase. O asteristico mostra o reconhecimento da proteína recombinante pelos soros. Em (B) membranas contendo extrato total de proteína de *Trypanosoma cruzi* (epimastigota) forma coradas com *ponceau* e então incubadas com soro pré-imune (PI) e anti-TcPCNA (camundongo ou coelho) diluído 1:200 e anti IgG (KPL) conjugada à peroxidase. O asteristico mostra o reconhecimento de uma banda na massa esperada para TcPCNA que é de 31,9 kDa.

Figura 4.9: **Purificação do soro de coelho anti-TcPCNA.** Coluna de níquel pré-fixada com TcPCNA recombinante foram utilizadas para purificar soro anti-TcPCNA. Membrana contendo extrato total de *Trypanosoma cruzi* (epimastigota) foram coradas com *ponceau* e então incubadas com o *Flow through* (FT) do soro e com as eluições (E) de 1 a 4, diluídos 1:20. A banda presente nas eluições contém a massa esperada do TcPCNA que é de 31,9 KDa.

A

B

Figura 4.10: Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* marcado com anti-TcPCNA. As setas indicam marcações para TcPNA. Em (A) menor aumento onde barra preta indica 0,2 μ m e em (B) maior aumento, a barra preta indica 0,5 μ m. N=núcleo e K=kinetoplasto.

Figura 4.11: Perfil de TcPCNA em epimastigotas de *T. cruzi* exposto à radiação gama.

Epimastigotas foram expostos à radiação gama a 500 gray por 2 horas, em seguida foram feitos extratos totais de proteína nos tempos 0, 24 e 48h após a irradiação, que foram analisados por *imunoblotting*. A membrana foi corada com ponceau e incubada com anti-TcPCNA diluído 1:50. A seta indica o TcPCNA na massa esperada se 31,9 KDa.

Figura 4.12: Dois padrões de TcPCNA no núcleo de epimastigota. Em (A) padrão disperso de TcPCNA e em (B) padrão periférico de TcPCNA. TcPCNA em verde e DAPI em azul. K=cinetoplasto, N=núcleo e barra=2 μ m. Microscopia confocal.

Figura 4.13: Série-Z de microscopia confocal dos padrões de TcPCNA durante ciclo celular. Em (A) série-Z do padrão disperso de TcPCNA, em (B) padrão periférico de TcPCNA. TcPCNA em verde e DAPI em azul. K=cinetoplasto, N= núcleo e as barras indicam 2μm. Microscopia Confocal. A distância entre os planos focais é de 1μm.

Figura 4.14: Padrões de TcPCNA no núcleo de epimastigota contendo nucléolo fluorescente. Em (A) padrão disperso de TcPCNA no núcleo, em (B) padrão periférico de TcPCNA. TcPCNA em vermelho, nucléolo em verde e DAPI em azul. K=cinetoplasto, N= núcleo e as barras indicam 2 μ m. Microscopia confocal.

Figura 4.15: Padrões de TcPCNA no núcleo de epimastigota durante o ciclo celular. Epimastigota em G1/S TcPCNA disperso pelo núcleo e TcPCNA localizado na periferia nuclear durante G1/S; epimastigota em G2 com padrão disperso de TcPCNA; epimastigota em mitose com TcPCNA disperso e em citocinese com núcleo com padrão disperso e outro com padrão periférico de TcPCNA. TcPCNA em verde, flagelo em vermelho e DAPI em azul. N=núcleo, K=kinatoplasto, F=flagelo. Barra= 2 μ m, setas indicam flagelo nascentes. Microscopia de fluorescência.

Figura 4.16: Incorporação de BrdU por 3h em epimastigotas. Após a incorporação, parasitas foram fixados, incubados com anti-BrdU e corados com DAPI. BrdU em verde e DAPI em azul. Barra= 2 μ m, N=núcleo e K=kinetoplasto.

Figura 4.17: TcOrc/Cdc6 e TcPCNA no núcleo de epimastigota. TcOrc/Cdc6 em verde, TcPCNA em vermelho e DAPI em azul. Em (A) TcOrc/Cdc6 e TcPCNA estão disperso pelo núcleo. Em (B) TcOrc/Cdc6 se localiza na periferia e TcPCNA disperso pelo núcleo. Em (C) tanto TcOrc/Cdc6 e TcPCNA estão na periferia nuclear. K=cinetoplasto, N= núcleo e as barras indicam 2 μ m.

Figura 4.18: Série-Z de TcOrc/Cdc6 e TcPCNA dispersos no núcleo de epimastigota. TcOrc/Cdc6 em verde, TcPCNA em vermelho e DAPI em azul. Microcopia confocal. A distância entre os planos focais é de 1 μ m. K=cinetoplasto, N=núcleo e as barras indicam 2 μ m.

Figura 4.19: Série-Z de TcOrc/Cdc6 periférico e TcPCNA disperso no núcleo de epimastigota. TcOrc/Cdc6 em verde, TcPCNA em vermelho e DAPI em azul. Microscopia confocal. A distância entre os planos focais é de 1 μ m. K=cinetoplasto, N= núcleo e as barras indicam 2 μ m.

Figura 4.20: Série-Z de Orc/Cdc6 e TcPCNA na periferia nuclear de epimastigota. Orc/Cdc6 em verde, TcPCNA em vermelho e DAPI em azul. Microscopia confocal. A distância entre os planos focais é de 1 μ m. K=cinetoplasto, N=núcleo e as barras indicam 2 μ m.

Figura 4.21: Aumento maior dos padrões de TcOrc/Cdc6 e TcPCNA no núcleo epimastigota. Em (A) TcOrc/Cdc6 e TcPCNA dispersos (43%), (B) TcOrc/Cdc6 na periferia nuclear e TcPCNA disperso (25%) e (C) TcOrc/Cdc6 e TcPCNA na periferia nuclear (32%). TcOrc/Cdc6 em verde, TcPCNA . Microcopia confocal. Barras indicam 2 μ m.

5 DISCUSSÃO

Pouco se sabe sobre a dinâmica das mudanças nucleares que ocorrem durante o ciclo celular. Neste trabalho apresentamos a dinâmica da maquinaria de pré-replicação e replicação durante o ciclo celular da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*.

5.1 Replicação na Periferia Nuclear

A fim de confirmarmos a localização dos sítios de replicação no núcleo de *Trypanosoma cruzi* já descrito por Elias e cols (2002), ensaio de incorporação de Bromodeoxiuridina (BrdU) foi feito. Este ensaio confirmou que a replicação ocorre apenas na periferia nuclear, onde a incorporação de BrdU pode ser observada (Figura 4.16).

5.2 Dinâmica da Maquinaria de Pré-replicação

TcOrc/Cdc6 é a primeira proteína do complexo de pré-replicação que se liga ao DNA e foi usada como marcador da maquinaria de pré-replicação. Em ensaio de imunofluorescência TcOrc/Cdc6 apresentou diferentes padrões de localização nuclear durante as fases do ciclo celular de epimastigota, demonstrando estar em movimento dentro do núcleo (Figura 4.4). Em todas as fases do ciclo celular de epimastigota, TcOrc/Cdc6 pode ser encontrado espalhado por todo o núcleo e apenas durante as fases G1/S as moléculas dispersas pelo núcleo migram para a periferia nuclear. As células com o padrão de 1N1K1F (fases G1 e S do ciclo celular) são cerca de 80% de uma cultura exponencial e destas, 75% estão em G1 e as outras 25% estão em S (Elias, et al., 2007). Das células com este padrão, 40,5% apresentaram o padrão disperso e 59,5% padrão periférico de TcOrc/Cdc6. Estes dados nos permitem concluir que TcOrc/Cdc6 migra para a periferia nuclear quando a célula ainda está em G1. É importante salientar que TcOrc/Cdc6 permanece ligada à cromatina durante todo ciclo celular de epimastigota (Figura 4.6) e que esta também se movimenta pelo núcleo (Elias, et al., 2002). Assim, quando os cromossomos migram para a periferia nuclear levam junto TcOrc/Cdc6. Quando os cromossomos se dispersam, TcOrc/Cdc6 também se dispersa.

Cabe ressaltar que enquanto os cromossomos encontram-se na periferia nuclear nas fases de mitose e citocinese (Elias, et al., 2002 e Figura 5.1), as moléculas de TcOrc/Cdc6 estão dispersas no núcleo. O movimento cromossômico no núcleo de *T. cruzi* foi observado

utilizando-se sonda para DNA satélite. Assim, é possível que esta aparente discrepância seja porque TcOrc/Cdc6 não interage com DNA satélite. Neste caso, nas fases de mitose e citocinese os cromossomos ligados a TcOrc/Cdc6s estariam dispersas pelo núcleo, enquanto os clusters de DNA satélite estariam em “loops” de cromatina na periferia nuclear.

5.3 Dinâmica da Maquinaria de Replicação

Para analisar a localização da maquinaria de replicação no espaço nuclear, TcPCNA foi utilizado em ensaios de imunofluorescência. Sua dinâmica durante o ciclo celular de epimastigota se mostrou igual à de TcOrc/Cdc6, onde durante todas as fases do ciclo TcPCNA está disperso pelo núcleo e apenas nas fases G1/S migra para a periferia nuclear (Figura 4.15). Das células com 1N1K1F, 65% apresentaram o padrão disperso e 35% o padrão periférico de TcPCNA. Como 25% das células com este padrão são células em fase S, concluímos que a maioria de TcPCNA migra para periferia nuclear no início da fase S. O fato de 25% das células com este padrão estar na fase S e encontrarmos 35% de TcPCNA na periferia do núcleo pode ser devido a dois fatores: (i) variação de contagem ou (ii) que parte de TcPCNA migre para periferia nuclear ainda em G1.

5.4 Dinâmica Nuclear Durante G1/S

Como pode ser observado, a mudança dos padrões de TcOrc/Cdc6 e TcPCNA se restringe a G1/S, quando passam de dispersos para periféricos, enquanto que em G2, mitose e citocinese permanecem dispersos pelo núcleo (Figuras 4.4 e 4.15). Assim, para poder entender a dinâmica das maquinarias de pré-replicação e replicação ao mesmo tempo, os dois marcadores destas maquinarias, anti-TcOrc/Cdc6 e anti-TcPCNA respectivamente, foram utilizados para dupla marcação em imunofluorescência e três combinações diferentes dos padrões de TcOrc/Cdc6 e TcPCNA foram observadas: (1) tanto TcPCNA quanto TcOrc/Cdc6 estavam dispersos pelo núcleo (Figura 4.21:A), (2) TcPCNA disperso e TcOrc/Cdc6 periférico (Figura 4.21:B) e (3) ambos na periferia nuclear (Figura 4.21:C). Estes dados comprovam que TcOrc/Cdc6 migra para periferia nuclear antes de TcPCNA.

Os resultados obtidos neste trabalho levam a seguinte conclusão sobre a dinâmica destas moléculas: células em G1, os cromossomos se encontram dispersos pelo núcleo, logo TcOrc/Cdc6 também está disperso do mesmo modo que TcPCNA. Pouco antes de a célula entrar na fase S, ainda em G1, os cromossomos migram para periferia nuclear, levando

consigo TcOrc/Cdc6. Neste momento a replicação ainda não foi iniciada, portanto TcPCNA permanece disperso pelo núcleo. Após a ativação do complexo de pré-replicação, formado por TcOrc/Cdc6 e MCM₂₋₇ em *T. cruzi*, a célula entra na fase S, onde se tem o início da duplicação do DNA. Então a maquinaria de replicação (TcPCNA) migra para periferia nuclear onde irá iniciar e terminar a replicação. As regiões de co-localização de TcOrc/Cdc6 e TcPCNA (regiões em amarelo na Figura 4.21 C) apontam para pontos específicos onde a replicação se inicia. Estes dados mostram que a replicação não ocorre na periferia devido a presença prévia das moléculas de replicação, mas é necessária a migração destas moléculas para a periferia nuclear, onde a replicação ocorrerá.

5.5 Formação Auto-Organizada dos Sítios de Replicação em *Trypanosoma cruzi*

O modo como se formam os sítios dos diversos processos nucleares, incluindo a replicação do DNA, está começando a ser esclarecido. Dois modelos têm sido propostos: modelo determinístico e auto-organização do núcleo. No modelo determinístico as estruturas ditam as funções, ou seja, as estruturas que formam o núcleo estão dispostas de tal maneira que há local determinado para que cada evento ocorra, assim os compartimentos funcionais do núcleo, como sítios de replicação e transcrição, por exemplo, são estabelecidos pelas estruturas nucleares estáveis, tais como a rede de lamina e filamentos de actina. Já o modelo de auto-organização nuclear é baseado na interação dinâmica das moléculas nucleares. Então, em determinado momento moléculas solúveis são recrutadas e passam a interagir com o DNA ou mesmo com proteínas que já estejam ligadas a ele formando um sítio funcional temporário, que se desfaz quando tal processo acaba (Misteli, 2007). Como já dito aqui, em levedura a formação dos sítios de replicação ocorre de forma auto-organizada, pois na falta de uma proteína inicial, a Cdc6, as demais proteínas por ele recrutadas não se unem, portanto o sítio não é formado (Kitamura et al, 2006).

Em *Trypanosoma cruzi* a formação dos sítios de replicação parece ser de forma auto-organizada, pois as moléculas DNA, Orc/Cdc6 e TcPCNA, que se encontram dispersadas pelo núcleo, migram no momento da replicação para os sítios de replicação e voltam a se dispersar pelo núcleo quando o processo é encerrado. Além disso, a maquinaria de pré-replicação chega primeiro na periferia nuclear e parece recrutar as moléculas de TcPCNA solúveis no nucleoplasma para que o sítio de replicação se forme.

5.6 Por que Replicar na Periferia Nuclear?

A replicação em eucariotos, como mamíferos (Brande, et al., 2007 e revisado em Cook, 2002) e *Drosophila* (Easwaran, et al., 2007), ocorre em diversos sítios de replicação que estão espalhados por todo núcleo. Então por que a replicação em *Trypanosoma cruzi* ocorre em sítios de replicação localizados na periferia nuclear? Algumas evidências podem nos ajudar a entender.

Os tripanosomatídeos parecem ser originários de uma ramificação muito antiga na evolução dos eucariontes, assim se acredita que suas características se assemelhem muito aos antigos eucariontes (Tibayrenc e Ayala, 1988). De fato *Trypanosoma cruzi*, que é um tripanosomatídeo, apresenta menor complexidade que os demais eucariotos. Sua transcrição, por exemplo, é policistrônica não havendo sítios promotores para RNA polimerase II, o que sugere a falta de controle da expressão gênica transcricional. Tal simplicidade nos leva a crer que a separação espacial da replicação e transcrição poderia ser uma forma simples de organizar os processos dentro do núcleo, evitando assim que eles se sobreponham. Portanto a transcrição seria realizada no interior nuclear (Dossin e Schenkman, 2005) enquanto a replicação do DNA ocorreria na periferia. Outro fato importante é que a importação dos nucleotídeos, do citoplasma para o núcleo, que são utilizados na síntese da nova molécula de DNA ocorre pelos poros do envelope nuclear (Sorokin, et al., 2007), então logo que são importados para o núcleo podem ser facilmente utilizados no processo de replicação.

Em células de humanos a proteína Cdc6 parece interagir com uma proteína do envoltório nuclear (HA95) que permite a estabilização do complexo de pré-replicação e impede sua degradação (Martins, et al., 2003). Portanto, TcOrc/Cdc6 poderia estar interagindo com alguma proteína do envelope nuclear de *T. cruzi*, levando a replicação para a periferia nuclear. Como em *T. cruzi* não há formação de cromossomos durante a mitose, a replicação na periferia seguida da permanência dos cromossomos nesta região facilitaria a segregação dos cromossomos durante a mitose fechada.

Elias e cols (2002) demonstraram que a replicação do DNA ocorre na periferia do núcleo, para onde os cromossomos migram na transição G1/S do ciclo celular. Uma explicação para este fenômeno seria que os fatores envolvidos neste processo ficassem sempre confinados na periferia nuclear. Neste trabalho, no entanto, nós mostramos que as moléculas da maquinaria de pré-replicação e de replicação também precisam migrar para a periferia nuclear para que ocorra a síntese de DNA.

Figura 5.1: Representação esquemática da dinâmica dos cromossomos, TcOrc/Cdc6 e TcPCNA no núcleo de *T. cruzi* durante o ciclo celular. Em azul cromossomos, em verde TcOrc/Cdc6 e em vermelho TcPCNA. TcOrc/Cdc6 permanece ligada ao DNA durante todo ciclo celular. No início de G1/S cromossomos, TcOrc/Cdc6 e TcPCNA encontram-se dispersos pelo núcleo. Cromossomos e TcOrc/Cdc6 migram para periferia nuclear enquanto TcPCNA permanece disperso. Ao entrar em S TcPCNA vai para periferia onde o DNA será duplicado. Nas demais fases G2, M (mitose) e C (citocinese) cromossomos, TcOrc/Cdc6 e TcPCNA estão dispersos pelo núcleo.

6 CONCLUSÃO

Ainda sem conhecer as bases moleculares que fazem com que a replicação ocorra na periferia nuclear, este trabalho deixa claro que a organização nuclear é evidente em *T.cruzi* e que este parece ser um modelo bastante interessante para se entender a organização nuclear em organismos que divergiram tão cedo da linhagem eucarionte.

REFERÊNCIAS*

- Adkins NL, Watts M, Georgel PT. To the 30-nm chromatin fiber and beyond. *Biochem Biophys Acta*. 2004;1677:12-23.
- Barry ER, Bell SD. DNA replication in the Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006;4:876-87. Review.
- Bell SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cell. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:333-74.
- Borden J, Manuelidis L. Movement of the X chromosomes in epilepsy. *Science*. 1988;242:1687-91.
- Brand N, Faul T, Grummt F. Interactions and subcellular distribution of DNA replication initiation proteins in eukaryotic cells. *Mol. Genet. Genomics*. 2007;278:623-32.
- Brisse S, Barnabe'C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol*. 2000;30:35-44.
- Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: Origin of metacyclic trypomastigotes in liquid media. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1964;6:93-100.
- Chagas C. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o cyclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova morbidade do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1909;1:159-218.
- [Chakalova L](#), [Debrand E](#), [Mitchell JA](#), [Osborne CS](#), [Fraser P](#). Replication and transcription: shaping the landscape of the genome. *Nat Rev Genet*. 2005 Sep;6(9):669-77. Review.
- Chuang CH, Belmont A.S. Moving chromating within the interphase nucleus-controlled transitions? *Cell & Dev. Biol*. 2007;18: 698-706.
- Clark CG, Pung OJ. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1994;66:175-9.
- Cook PR. Organizaton of replication and transcription. *Science*. 1999;284: 1790-5.
- Cook PR. Predicting three-dimensional genome structure from transcriptional activity. *Nat. Genet*. 2002;32:347-52.
- Cremer T, Cremer C, Baumann H, Luedtke EK, Sperling K, Teuber V, Zorn C. Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. *Hum. Genet.* 1982;60:46-56.

Cremer, T.; Lichter, P.; Borden, J.; Ward, D.C & Manuelidis, L. (1988). Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum. Genet.* 80, 235-246.

Cremer M, Von Hase J, Volm T, Brero A, Kreth G, Walter J, Fisher C, Solovei I, Cremer C, Cremer T. Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosomes Res.* 2001;9:541-67.

De Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int.Rev.Cytol.* 1984;86:197-283.

De Souza W. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol Res.* 2002;12:1013-25.

De Souza CPC, Osmani AS. Mitosis, not just open or closed. *Eukaryotic Cell.* 2007;6:1521-7.

Devera R, Fernandez O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98:1-12.

Dimitrova DS, Berezney R. The spatio-temporal organization of DNA replication sites is identical in primary, immortalized and transformed mammalian cells. *J.Cell Sci.* 2002;115:4037-51.

Dillon N, Festenstein R. Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet.* 2002;18: 252-8.

Dossin FM, Schenkman S. Actively transcribing RNA polymerase II concentrates on spliced leader genes in the nucleus of *Trypanosoma cruzi*. *Eukaryot Cell.* 2005;5:960-70.

Dundr M, Misteli T. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem.* 2001;35:297-310.

Easwaran HP, Leonardt H, Cardoso MC. Distribution of DNA replication proteins in *Drosophila* cells. *BMC Cell Biol.* 2007;8:42.

Elias MC, Marques-Porto R, Freymüller E, Schenkman S. Transcription rate modulation throughout the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. *Mol. Biochem. Paras.* 2001;112:79-90.

Elias MC, Faria M, Mortara RA, Motta MC, de Souza W, Thiry M, Schenkman S. Chromosome localization changes in the *Trypanosoma cruzi* nucleus. *Eukaryot Cell.* 2002; 6:944-53.

Elias MC, Cunha JPC, Faria FP, Mortara RA, Freymüller E, Schenkman S. Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. *Protist.* 2007;158:147-57.

Ferreira J, Paoletta G, Ramos C, Lamond AI. Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories. *J. Cell. Biol.* 1997;139:1597-1610.

Garg P, Burgers PMJ. DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork. *Critical Reviews in Biochem. And Mol. Biol.* 2005;40:115-128.

Gilbert N, Boyle S, Fiegler H, Woodfine K, Carter NP, Bickmore WA. Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell.* 2004;118: 555-66.

Gulbis JM, Kelman Z, Hurwitz J, O'Donnell M, Kuriyan J. Structure of the C- terminal region of p-21 (WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell.* 1996;87:297-306.

Heun P, Taddei A, Gasser M. Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus. *Science.* 2001;294: 2181-6.

Indiana C, O'Donnell M. The replication clamp-loading machine at work in the three domains of life. *Mol. Cell Biol.* 2006;7:751-61.

Jackson DA. The principles of nuclear structure. *Chrom Res.* 2003;11:387-401.

Kalverda B, Röling MD, Fornerod M. Chromatin organization in relation to the nuclear periphery. *FEBS letters.* 2008;582: 2017-22.

Kitamura E, Blow JJ, Tanaka TU. Live-cell imaging reveals replication of individual replicons in eukaryotic replication factories. *Cell.* 2006;125:1297-1308.

Kosak ST, Skok JA, Medina KL, Riblet R, Le Beau MM, Fisher AG, Singh H. Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science.* 2002;296:158-162.

Lamond AI, Earnshaw WC. Structure and function in the nucleus. *Science.* 1998;280:547-53.

Lamond AI, Spector DL. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003;4:605-12.

Liu B, Liu Y, Motyka SA, Agbo EEC, Englund PT. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends in Paras.* 2005;21:363-9.

Lundgren M, Bernander R. Archaeal cell cycle progress. *Current Opinion in Microbiol.* 2005;8:662-8).

Lukeš J, Hashimi H, Zihová A. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr. Genet.* 2005;48:277-99.

Machida YJ, Dutta A. Cellular checkpoint mechanisms monitoring proper initiation of DNA replication. *J. Biol. Chem.* 2005;8:6253-6.

- Macedo AM, Oliveira RP, Pena SDJ. Schematic representation of the life cycle of the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. 2002 (<http://www.expertreviews.org/0200412Xh.htm>)
- Martins S, Eikar S, Furukawa K, Collas P. HA95 and LAP2 β mediate a novel chromatin-nuclear envelope interaction implicates in initiation of DNA replication. *JBC*. 2003;20:177-88.
- Mcgeoch AT, Bell SD. Extra-chromosomal elements and the evolution of cellular DNA replication machineries. *Mol. Cell Biol*. 2008;9:569-74.
- Misteli T. The concept of self-organization in cellular architecture and gene expression. *Science*. 2001;291:843-7.
- Misteli T. Concepts in nuclear architecture. *Bioessays*. 2005;27:477-87.
- Misteli T. Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell*. 2007;128:787-800.
- Modolvan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*. 2007;4:665-79.
- Nakamura H, Morita T, Sato C. Structural organizations of replicon domains during DNA synthetic phase in the mammalian nucleus. *Exp. Cell. Res*. 1986;165:291-7.
- Osborne CS, Chakalova L, Brown KE, Carter D, Horton A, Debrand E, Goyenechea B, Mitchell JA, Lopes S, Reik W. Active genes dynamically colocalize to Nuclear architecture and gene expression. *Nat. Genet*. 2004;36:1065–71.
- Osborne CS, Chakalova L, Mitchell JA, Horton A, Wood AL, Bolland DJ, Corcoran AE, Fraser P. Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh. *PLoS Biol*. 2007;5:192.
- Palenchar JB, Bellofatto V. Gene transcription in trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol*. 2006;146:135-41.
- Pickersgill H, Kalverda B, de Wit E, Talhout W, Fornerod M, van Steensel B. Characterization of the *Drosophila melanogaster* genome at the nuclear lamina. *Nat Genet*. 2006;38:1005-14.
- Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray J. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1988;85:9138–42.
- Postberg J, Alexandrova O, Cremer T, Lipps H J. Exploiting nuclear duality of ciliates to analyse topological requirements for DNA replication and transcription. *J. Cell Sci*. 2005;118:3973-83
- Ragoczy T, Bender MA, Telling A, Byron R, Groudine M. The locus control region is required for association of the murine beta-globulin locus with engaged transcription factories during erythroid maturation. *Genes Dev*. 2006;20:1447-57.

- Schneider R, Grosschedl. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes & Dev.* 2007;21:3027-43.
- Solari AJ. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. *Chromosoma.* 1980;78:239-55.
- Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP. Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry.* 2007;13:1439-57.
- Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology.* 1999;118:107-16.
- Tatsumi Y, Tsurimoto T, Shirahige K, Yoshikawa H, Obuse C. Association of Human Origin Recognition Complex 1 with Chromatin DNA and Nuclease-resistant Nuclear structures. *The Journal of Biol. Chem.* 1999;275:5904-10.
- Tibayrenc M, Ayala F. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas's disease: genetical, taxinomial and epidemiological significance. *Evolution.* 1988;42:277-92.
- Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.* 2001;31:472-81.
- Verschure PJ. Positioning the genome within the nucleus. *Biol. of the Cell.* 2004;96:569-77.
- Walter J, Schermelleh L, Cremer M, Tashiro S, Cremer T. Chromosome order in HeLa cells changes during mitosis and early G1, but is stably maintained during subsequent interphase stages. *J. Cell Biol.* 2003;160:685-97.
- Wansink DG, Schul W, van der Kraan I, van Steensel B, van Driel R, Jong L. Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J. Cell Biol.* 1993;122:282-93.
- Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdom. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1977;74:5088.
- Wolffe AP, Guschin D. Chromatin Structural Features and Targets that Regulate Transcription. *J. of Struct. Biol.* 2000;129:102-22.
- Zakrzewska-Czerwinska J, Jakimowicz D, Zawilak-Pawlik A, Messer W. Regulation of initiation of chromosomal replication in bacteria. *FEMS Microbial Rev.* 2007;31:378-87.