SIMONE GUEDES CALDERANO

Alternativas da Replicação do DNA: vias de controle e dinâmica das forquilhas em *trypanosomas*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo 2013

SIMONE GUEDES CALDERANO

Alternativas da Replicação do DNA: vias de controle e dinâmica das forquilhas em *trypanosomas*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

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

Versão original

São Paulo 2013

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

reprodução não autorizada pelo autor

Calderano, Simone Guedes.

Alternativas da Replicação do DNA: vias de controle e dinâmica das forquilhas em trypanosomas / Simone Guedes Calderano. -- São Paulo, 2013.

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

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

Versão do título para o inglês: DNA Replication Alternatives: control pathways and fork dynamic in trypanosomas.

 Replicação do DNA 2. Trypanosoma cruzi 3. Trypanosoma brucei
SMARD 5. Controle da replicação do DNA 6. Origem de replicação I. Sabbaga, Profa. Dra. Maria Carolina Quartim Barbosa Elias II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0175/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Simone Guedes Calderano.
Título da Tese:	Alternativas da Replicação do DNA: vias de controle e dinâmica das forquilhas em trypanosomas.
Orientador(a):	Profa. Dra. Maria Carolina Quartim Barbosa Elias Sabbaga.
A Comissão Ju	ulgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
públic	a realizada a///, considerou
	() Aprovado(a) () Reprovado(a)
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) (011) 3091.7733 - e-mail: cepuicb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 164 nas fls. 79 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Maria Carolina Q.B.Elias, Coordenador(a) da Linha de pesquisa Caracterização biológica e bioquímica das MCMs durante ciclo celular de trypanosoma cruzi do qual participou(aram) o(s) alunos Simone Guedes Calderano, está de acordo com os Principios Eticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em 15.12.09, com validade de 3 anos.

São Paulo, 16 de dezembro de 2009.

Prof.Dr.Wothan Tavares de Lima Coordenador CEEA - ICB/USP

the lite Jami

Profa.Dra.PATRICIA GAMA Secretária CEEA – ICB/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitària "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cop. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil Telefone :(55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.108.12 WTL/mcgn

São Paulo, 20 dezembro de 2012.

REF.: Protocolo nº 164/09.

"Caracterização biológica e bioquímica das MCMs durante ciclo celular de trypanosoma cruzi"

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, foi prorrogada até 15.12.2015.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

P/ Suus Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilma.Sra.

Prof^a Dra. Maria Carolina Q.B.Elias Departamento de Parasitologia Instituto de Ciências Biomédicas - USP

À minha amada família Às minhas filhas Letícia e Larissa Ao meu marido Wagner Aos meus pais Lemuel e Elena Às minhas irmãs Ester e Patricia Aos meus sobrinhos Nicolas e Lívia Vocês completam minha vida e me fazem muito feliz!

AGRADECIMENTOS

A Deus que tem me ajudado em todos os momentos de minha vida, me permitindo realizar meus sonhos e projetos, colocando sempre pessoas muito especiais em meu caminho.

A toda minha família que sempre tem me apoiado e ajudado de maneiras que me deixam sem palavras para expressar minha gratidão.

À minha filha Letícia, tesouro mais precioso de minha vida, sua energia, alegria e carinho me encantam e me fazem te amar de maneira que nunca havia pensado ser possível. Eu te "mamo" muito minha princesa.

A minha filha que ainda carrego comigo Larissa, você é um presente especial muito querida por todos nós. Ter você comigo neste momento torna tudo muito mais especial. Também te amo demais florzinha.

Ao meu marido Wagner, companheiro de todos os momentos, você é minha inspiração, te admirido demais. Cada dia te amo mais e me sinto muito priviliegiada por ter você em minha vida.

Aos meus pais Lemuel e Elena, muito obrigada pelos ensinamentos que me permitiram fazer as escolhas certas e chegar até aqui. Admiro muito tudo o que construíram e a família maravilhosa que vocês cultivaram. Amo demais vocês.

As minhas irmãs Ester e Patricia. Té você sempre vai ser minha irmãzinha mais nova, sua amizade é muito especial para mim. Paty mesmo estando longe, conseguimos manter uma amizade muito gostosa e quando estamos perto é como se nunca tivessemos nos separado. Obrigada as duas pelos sobrinhos lindos, Lívia e Nicolas, eles completam ainda mais minha vida. Amo muito todos vocês.

Aos meus sogros, Rita e Sebastião, muito obrigada por sempre me ajudarem, muito mais agora com estas pequenas em minha vida. Aos meus cunhados Débora, Rafael, Douglas, Natan e Davi. Com vocês tudo fica mais divertido.

À minha orientadora Dra. Maria Carolina Elias. Carol, já são sete anos de trabalho e durante este tempo aprendi muito com você em como ser profissional e cientista. Vou guardar com carinho tudo o que passamos nestes anos. Obrigada por

acreditar em mim e me apoiar em todos os momentos. Você me fez acreditar que posso ser uma cientista e me mostrou como conciliar isso com a maternidade. Obrigada!

Ao Dr. Hugo Armelin por ter convidado nosso grupo a fazer parte do CAT. Estar neste departamento foi essencial para que pudéssemos desenvolver este projeto.

Ao Dr. Carl Schilkraut por me receber tão bem em seu laboratório na Albert Einstein College of Medicine. À Janine, Bill e Tom por me ensinarem a técnica de SMARD além da amizade durante os meses que estivemos juntos.

Aos meus colegas de bancada.

Daiane nossas conversas sempre foram muito proveitosas para mim. Aprendi muito de mim com os seus conselhos e sua sinceridade. Desejo a você muito sucesso, porque você é uma batalhadora e merece tudo de bom.

Ricardo, obrigada pela sua amizade e por me ajudar diversas vezes. Ainda bem que você mora no CRUSP né! Foi muito bom podermos dividir a bancada durante estes anos.

Raphael você é uma figura, obrigada pelas risadas. Também te desejo muito sucesso.

Marina obrigada pela companhia e amizade. Muita sorte nessa nova etapa de sua vida. Espero que você continue na ciência, porque você tem um talento natural para isso.

Teresa sua amizade é muito especial, obrigada pelas conversas e dicas. O FACS dos bruceis só saiu com as suas valiosas dicas.

Patricia, você já não está mais no laboratório, mas sua amizade nos anos que estivemos juntas foi muito importante para mim.

Aos técnicos Ivan e Mariana, obrigada pela ajuda e amizade. Vocês facilitam muito nossas vidas no laboratório.

Aos colegas do LECC muito obrigada pela troca de informções e por sempre estarem dispostos a ajudar. Em especial a Juliana Dias que me ensinou o *real time PCR* com uma disposição e atenção incríveis.

A todos os pesquisadores, alunos e funcionários do CAT.Obrigada nos receberem tão bem. Em especial à Evelyn e Lidiane que estiveram sempre dispostas a me ajudar com o citômetro de fluxo.

A todos os pesquisadores, funcionários e alunos do departamento de parasitologia, que foi onde tudo começou. Obrigada pela amizade e companheirismo.

Ao Dr. Sérgio Schenkman e todos de seu laboratório por sempre estarem dispostos a nos ajudar. Obrigada pela paciência nas infindáveis buscar pelas geladeiras.

A todos que de alguma forma ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Pensava que nós seguíamos caminhos já feitos, mas parece que não os há. O nosso ir faz o caminho.

C.S. Lewis

RESUMO

Calderano SG. Alternativas da Replicação do DNA: vias de controle e dinâmica das forquilhas em *trypanosomas*. [Tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A replicação do DNA é um passo crucial no ciclo celular e que deve garantir às células-filhas cópias fiéis do material genético da célula mãe. Para tanto várias origens de replicação, pontos de início da duplicação do DNA, são licenciadas pelas proteínas do complexo de pré-replicação (CPR), recrutam na fase S proteínas responsáveis pela duplicação do DNA. Das diversas origens de replicação licenciadas, apenas algumas são disparadas e em diferentes momentos da fase S, havendo assim origens early (replicadas no início de S) e origens late (replicadas mais tardiamente). Com a finalidade de controlar a replicação evitando que a mesma origem seja disparada mais de uma vez, ou mesmo que regiões do DNA deixem de ser replicadas, as proteínas do CPR devem ser inativas durante e após a fase S do ciclo celular. Em trypanosomas o CPR é formado por uma proteína Orc1/Cdc6, responsável em reconhecer as origens de replicação, juntamente com o complexo MCM2-7, que possui atividade de helicase para abertura da dupla fita de DNA. Desta forma queremos entender como ocorre o controle da replicação do DNA tanto no ciclo celular (forma epimastigota) quanto no ciclo de vida de Trypanosoma cruzi, através das proteínas do CPR. Pudemos observar que as proteínas TcOrc1/Cdc6 e TcMCM7 não apresentam aparente papel no controle da replicação do ciclo celular de epimastigota em T. cruzi, já que são expressas em todas as fases do ciclo celular permanecendo sempre ligadas ao DNA. Durante o ciclo de vida, no entanto, TcOrc1/Cdc6 é expressa nos diferentes estágios do ciclo de vida, mas interage com o DNA apenas nas formas que são replicativas. TcMcm7 é expressa apenas nas formas replicativas, onde interage com o DNA, mas está ausente nas formas não replicativas. Assim diferentes mecanismos de controle da duplicação do DNA operam no ciclo de vida e no ciclo celular de T. cruzi. Outro objetivo deste trabalho foi estabelecer a dinâmica da forquilha de replicação de parte do cromossomo I de Trypanosoma brucei através da técnica de SMARD. Esta técnica, que foi aqui padronizada para análise da replicação em trypanosomas, permite analisar o perfil de replicação de moléculas únicas de DNA. A partir da análise da replicação de parte do cromossomo I de T. brucei, foi possível demosntrar que a velocidade da forquilha de replicação de T. brucei é semelhante aquela encontrada nos demais organismos eucariontes. Mais que isto, foi possível observar que este fragmento de DNA pode ser replicado por forquilhas provenientes de pelo menos três origens diferentes localizadas nas regiões 5` e 3`, fora do segmento analisado, e por uma nova origem de replicação encontrada nesta região analisada. Ainda foi possível estabelecer vários padrões de replicação no qual apenas uma ou até mesmo as três forquilhas participam da replicação deste fragmento. Finalmente, vimos que a nova origem encontrada pode não ser disparada e que é uma origem disparada tardiamente em S, sendo a primeira origem de replicação late descrita em T. brucei.

Palavras-chave: Replicação do DNA. *Trypanosoma cruzi. Trypanosoma brucei.* SMARD. Controle da replicação do DNA. Origem de replicação.

ABSTRACT

Calderano, S. G. DNA Replication Alternatives: control pathways and forks dynamic in *trypanosomas*. 2013. [Thesis (Ph. D. Thesis in Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2013.

The DNA replication is a crucial step on the cell cycle, which should guarantee to the daughter-cells faithful copies as its mother-cell DNA. For that many origins of replication, points where DNA duplication starts, are licensed by the pre replication complex (PRC) proteins that are activated during S phase, when the proteins responsible for DNA replication are recruited. From the many licensed origins, just some of them is fired during S phase with different timing, since some origins are fired at early and others later (early and late origins). In order to control DNA replication avoiding over replication or under replication of DNA sequences, the PRC proteins are recruited to the origins only during the M/G1 transition phases and after its activation the PRC is disassembled. The PRC in trypanosomes is composed by the Orc1/Cdc6, which recognizes the origins of replication, and MCM2-7 complex, that has helicase activity capable of unwinding the DNA double strand. In this way we wanted to understand how DNA replication occurs at the cell cycle (epimastigote form) and life cycle of Trypanosoma cruzi. We could observe that TcOrc1/Cdc6 and TcMcm7 don't have an apparent role in cell cycle DNA replication control in epimastigote, once they are expressed during all the cell phases and are bound to DNA during the entire cell cycle. On the other hand, TcOrc1/Cdc6 is expressed in all different stages of T. cruzi life cycle, but it is bound to the DNA only in the replicative forms. Moreover, TcMcm7 is expressed just in the replicative forms, when it is DNA bound, but it is absent in the non-replicative forms. So, different mechanisms operate to control the DNA replication in the cell cycle and life cycle of T. cruzi. In addition, we also wanted to established the replication fork dynamic of the chromosome I central region from Trypanosoma brucei through the SMARD technique. This technique, which has been standardized here for DNA replication in trypanosomes, allows the single molecule analysis of DNA replication profile. Based on the analysis of the chromosome I central region, we observed that this DNA fragment can be replicated by forks from at least three origins of replication localized at the 5' and 3' region (outside the analyzed sequence) and from a new origin of replication within this fragment. We identified different patterns of replication in which one or even the three forks participates on this fragment replication. Moreover the new origin of replication found within the analyzed fragment is a late origin, being the first one described on T. brucei.

Key-words: DNA replication. *Trypanosoma cruz. Trypanosoma brucei.* SMARD. DNA replication control. Origin of replication.

LISTA DE SOLUÇÕES

Coomassie: 1g de coomassie R250; 100mL de ácido acético glacial; 400mL de metanol e 500mL de água Milli-Q.

FB: 100mM KCI; 50mM CaCl2.2H2O; 10% glicerol (m/V); 10mM acetato de potássio; pH6,2.

Hemina: solução estoque de 2,5 mg/mL em 50 mM de NaOH. Autoclavar e manter alíquotas a 4 °C.

Meio TAU: 2mM CaCl2; 17mM KCl; 2mM MgCl2; 190mM NaCl; 8mM tampão fosfato pH 6.

Meio TAU3aaG: meio TAU acrescido de 2mM L-aspartato, 50mM L-glutamato, 10mM L-prolina e 10mM de glicose.

Ponceau: 0,1% Ponceau e 1% ácido acético.

PBS1x: 137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na₂HPO₄; 1,8mM KH₂PO₄, acertar para pH 7,4.

Sample Buffer 2X: 125mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 0,02% bromofenol azul; 20% glycerol; 5% β-mercaptoetanol.

Separator gel buffer: 1,5M tris-HCl pH8,8.

Solução descorante para Coomassie: 200mL de metanol; 100mL de ácido acético glacial; 700mL de água Milli-Q.

Stacking gel buffer: 0,5M tris-HCl pH6,8.

SSC 20X : 3M NaCl e 300mM Citrato de sódio.

Solução I lise alcalina: 0,9% de glicose (m/V); 25mM tris-HCl pH 8,0; 10mM EDTA.

Para 50mL: 0,45g de glicose; 1,25mL de tris-HCl 1M pH8,0; 1mL EDTA 0,5M.

Solução II lise alcalina: 1% SDS e 0,2N NaOH. Para 50mL: 2,5mL SDS 20% e 1mL NaOH 10N.

Solução III lise alcalina: 1,88M acetato de potássio e 11,2% de ácido acético glacial. Para 50mL: 14,8g de acetato de potássio e 5,6mL de ácido acético glacial.

Tampão coluna de amilose: 20mM tris-HCl pH 7,4; 200mM NaCl; 1mM EDTA.

Tampão de corrida: 25mM de tris-base; 19,2mM de glicina; 0,1% de SDS (*Sodium dodecyl sulfate*).

Tampão de digestão GELase: TE pH8; 100mM NaCl; 0,1% β-mercaptoetanol.

Tampão de extração: 10mM Tris-HCl pH 7,4; 100mM NaCl; 300mM sacarose; 3mM MgCl₂; 50mM NaF; 1mM Na₃VO₄; 0,5 mM PMSF; 0,1% Triton X-100 e coquetel de inibidores de protease – Roche.

Tampão de estocagem: 50mM EDTA; 10mM Tris-HCl pH8.

Tampão fosfato salina 2X: Na₂HPO₄ (anidro) 95mM; NaH2PO4.H2O 5mM; NaCl 72,7 mM; ou 13,48g; 0,69g e 4,25g respectivamente para 1 litro.

Tampão de Lise: 0,5M EDTA; 0,1% sarcosina (*N-Lauroylsarcosine sodium salt* - sigma).

Tampão de Transferência: 47,9mM de tris-base; 38,6mM de glicina; 0,037% de SDS (*Sodium dodecyl sulfate*); 20% de metanol.

Tampão de Injeção: 27mM K₂HPO₄; 8mM Na₂HPO₄; 26mM KH₂PO₄; acertar para pH7,2.

TAE 1X: 40mM Tris; 20mM ácido acético; 1mM EDTA; pH8,0.

TE 1X: Tris-HCI 10mM; 1mM EDTA; acertar para pH8.

TBE: 89mM Tris base; 0,89mM ácido bórico; 2mM EDTA.

Tampão de lise para ChIP: 50mM HEPES pH7,5; 140mM NaCl; 1mM EDTA; 0,1% de deoxicolato de sódio; 1% NP-40; 1mM PMSF e coquetel de inibidores de protease-Roche.

Tampão de lavagem de ChIP: 10 mM de Tris-HCl pH 8; 250 mM de LiCl; 0,5% de dioxicolato sódico; 1 mM de EDTA e 0,5% de NP-40.

Tampão de eluição de ChIP: 50 mM de Tris-HCl pH 8; 10 mM de EDTA e 1% de SDS.

Tampão de lise para *plugs***:** 0,5M EDTA e 1% sarcosina [*N-lauroylsarcosine sodium salt*/Sigma Aldrich].

Tampão de estocagem SMARD: 50 mM EDTA e 10mM Tris-HCl pH 8.

Tampão de pré-digestão SMARD: 10mM MgCl₂ e 10mM Tris-HCl pH8.

Tampão de transferência para Southern: 1,5M NaCl e 0,5M NaOH.

Tampão de digestão GELase: TE pH8, 100mM NaCl, 0,1% beta-mercaptoetanol.

Tampão de desnaturação SMARD: etanol 70%, 0,1% beta-mercaptoetanol, 0,1M NaOH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- Principais ciclinas-CDKs envolvidas na progressão do ciclo celular 26
Figura 1.2- Complexo de Pré-Replicação em Eucariotos e Arhaea29
Figura 1.3- Árvore filogenética da vida: bactéria, archaea e eucarioto
Figura 1.4- Ativação do Complexo de Pré-Replicação e início da síntese da nova fita de DNA32
Figura 1.5- Controle da replicação34
Figura 1.6- Nucleossomo e a estrutura da cromatina
Figura 1.7- Correlação entre transcrição e o momento da replicação38
Figura 1.8- Fatores limitantes influenciam o momento do disparo de origens early e late40
Figura 1.9- Papel das origens de replicação dormentes41
Figura 1.10- Mapa das áreas endêmicas de Trypanosoma cruzi44
Figura 1.11- Diferentes formas de <i>T. cruzi</i> durante seu ciclo de vida45
Figura 1.12- O ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> 46
Figura 1.13- Mapa da distribuição de incidências das duas principais subespécies de <i>Trypanosoma brucei</i> 47
Figura 1.14- Formas replicativas e não replicativas de <i>T. brucei</i> 48
Figura 1.15- Ciclo de vida de Trypanosoma brucei49
Figura 1.16- O ciclo de celular da forma epimastigota de Trypanosoma cruzi51
Figura 1.17- O ciclo de celular da forma procíclica de Trypanosoma brucei52
Figura 1.18- Complexo de pré-replicação em trypanosomas53
Figura 1.19- Regiões de início e terminação de transcrição54
Figura 3.1- Marcadores padrão para <i>Pulsed Field Gel.</i> Em (A) <i>S. cerevisiae</i> chromosomal DNA (Bio-Rad) e (B) <i>Lambda Ladder PFG Marker</i> (New England BioLabs® _{Inc} .)

Figura 3.2- Esquema do posicionamento dos <i>plugs</i> de agarose em gel de agarose para PFGE82
Figura 3.3- Esquema da transferência do DNA presente em gel de agarose para membrana de nylon (<i>Southern Blotting</i>)
Figura 3.4- Esquema do fatiamento da região central do PFGE recuperada e armazenada (à direita) e montagem de um gel de agarose 1% a partir destas fatias (à esquerda) que foi transferido para membrana de nylon e esta hibridizada com sonda específica
Figura 3.5- Esquemas de diferentes formas de esticar o DNA sobre lâmina pré- tratada com aminosilane
Figura 3.6- Esquema da montagem de uma câmara sobre a região da lâmina de SMARD que contém DNA
Figura 4.1- Expressão e purificação da proteína recombinante TcMcm7-MBP e obtenção de anti-TcMcm791
Figura 4.2- Expressão de TcOrc1/Cdc6, TcPCNA e TcMcm7 presente em todas as fases do ciclo celular de epimastigota92
Figura 4.3- TcOrc1/Cdc6 e TcMcm7 estão ligadas ao DNA em todas as fases do ciclo celular de epimastigota
Figura 4.4- Enquanto TcOrc/Cdc6 e TcPCNA são expressas em todos os estágio de vida de <i>T. cruzi</i> , TcMcm7 é expresso apenas nas formas replicativas95
Figura 4.5- TcOrc1/Cdc6, TcMcm7 e TcPCNA estão ligadas ao DNA apenas nas formas replicativas epimastigota e amastigota
Figura 4.6- Ilustração da técnica SMARD98
Figura 4.7- Incorporação de análogos de timidina em <i>T. brucei</i> procíclico99
Figura 4.8- Genoma haploide de Trypanosoma brucei TREU 927100
Figura 4.9- Isolamento do cromossomo I de <i>T. brucei</i> forma procíclica101
Figura 4.10- Cromossomo I de <i>T. brucei</i> esticado na lâmina102
Figura 4.11- Fragmento de 347 kb obtido por digestão do cromossomo I104
Figura 4.12- Amplificação sonda 3 de 10 kb e fragmentos de 5 kb das sondas meio e 2105
Figura 4.13- Amplificação sonda 2 e meio de 10 kb106

Figura 4.14- Purificação e marcação das sondas de 10 kb 2, meio e 3 para fragmento de 347 kb do cromossomo I107
Figura 4.15- Identificação e isolamento do fragmento de 347 kb do cromossomo l de <i>T.brucei</i> da forma procíclica108
Figura 4.16- O fragmento de 347 kb pode ser replicado por forquilhas 110
Figura 4.17- TbOrc1/Cdc6 interage com ORI 1112
Figura 4.18- ORI 1 e centrômero no cromossomo I de T. brucei114
Figura 4.19- Região centromérica replica primeiro que ORI 1115
Figura 4.20- ORI 1 é uma origem de replicação late117
Figura 4.21- Cálculo da velocidade de replicação das formas procíclicas e sanguículas de <i>T. brucei</i> 119
Figura 5.1 – Controle da replicação em trypanosomas124
Figura 5.2 – Perfil da replicação no cromossomo I de T. brucei128

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1- Componentes meio LIT
Tabela 3.2- Componentes meio SDM-7960
Tabela 3.3 – Parâmetros utilizados para análise do ciclo celular de Trypanosomasno aparelho FACs BD Callibur
Tabela 3.4- Sequência de primers utilizados na amplificação por PCR64
Tabela 3.5- Sequência primers CloneJET65
Tabela 3.6- Sequência de primers utilizados na amplificação por Real Time PCR.70
Tabela 3.7- Componentes para 5mL de stacking gel
Tabela 3.8- Componentes para 10mL de separating gel
Tabela 3.9-Volumes necessários de stacking e separating gel para as diferentes espessuras de géis73
Tabela 3.10- Anticorpos usados em ensaios de immunoblotting
Tabela 3.11- Primers para amplificação de sondas de 5 kb e 10 kb89

LISTA DE ABREVIAÇÕES

bp: base pair

- CDC: Cell Division Cycle
- CDK: Cyclin Dependent Kinase

CDT1: Cdc10-dependent transcript factor 1

- ChIP: Chromatin Imuno Precipitation
- CldU: Clorodeoxiuridina
- CPR: Complexo de Pré-Replicação
- CRK: Cyclin Related Kinase
- DDK: DBF4 Dependent Kinase

Fkh: Forkhead

GINS: Go Ichi Nii San (5,1,2 e 3 em janponês das proteínas que formam esse complexo: SId5, Psf1, Psf2, Psf3).

IdU: Iododeoxiuridina

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

- MBP: Maltose Binding Protein
- MCM: Minichromosome Maintenance

ORC: Origin Recognition Complex

- pRB: Proteína Retinoblastoma
- SMARD: Single Molecule Analysis of Replicated DNA

SUMÁRIO

1 INT	RODUÇÃO	24
1.1	Ciclo Celular: Ciclinas e CDKs	24
1.1.1	Transição G1/S	24
1.1.2	Progressão S/G2 e G2/M	25
1.2	Complexo de Pré-Replicação	26
1.2.1	Bactérias	27
1.2.2	Leveduras e Metazoários	27
1.2.2.	1 Origens de Replicação Específicas	27
<u>1.2.2.</u>	2 Proteínas do Complexo de Pré-Replicação	28
1.2.3	Archaea	29
1.3	Replicação do DNA em Eucariontes	31
1.3.1	Controle da Replicação	32
<u>1.3.1.1</u>	<u> ORC ₁₋₆</u>	33
<u>1.3.1.2</u>	<u>2 Cdc6</u>	33
<u>1.3.1.3</u>	<u>3 Cdt1 e MCM 2-7</u>	34
1.4	Origem de Replicação	35
1.4.1	Estutura da Cromatina	35
1.4.2	Origens de Replicação Early e Late	37
1.4.2.	1 Metazoários	37
1.4.2.	2 Leveduras	39
1.4.3	Origens Dormentes	41
1.5	Trypanosomas	43
1.6	Trypanosoma cruzi	43
1.6.1	Ciclo de Vida	44
1.7	Trypanosoma brucei	46
1.7.1	Ciclo de Vida	47
1.8	Ciclo celular em trypanosomas	49
1.8.1	T. cruzi forma epimastigota	50
1.8.2	T. brucei forma procíclica	51
1.8.3	Complexo de pré-replicação em trypanosomas	52
1.8.4	Replicação do DNA e seu controle em trypanosomas	53
1.8.5	Correlação entre transcrição e replicação em trypanosomas	54
1.8.5 2 OE	Correlação entre transcrição e replicação em trypanosomas 3JETIVOS	54 56

2.2	Objetivos Específicos	56
3 MA	TERIAIS E MÉTODOS	57
3.1	Cultura	57
3.1.1	Trypanosoma brucei	57
3.1.2	Trypanosoma cruzi (cepa Y)	57
3.1.2.1	1 Epimastigota	57
3.1.2.2	2 Tripomastigota metacíclico	57
3.1.2.2	2.1 Resina DEAE celulose	58
3.1.2.3	3 Tripomastigota	58
3.1.2.4	4 Amastigota	59
3.2	Meios de Cultura	59
3.2.1	LIT	59
3.2.2	SDM-79	60
3.3	Ensaio de Sincronização	61
3.3.1	Trypanosoma brucei	61
3.3.2	Trypanosoma cruzi	61
3.4	Extração DNA genômico	62
3.5	Citômetria de Fluxo	62
3.5.1	Fixação Trypanosoma brucei	62
3.5.2	Fixação Trypanosoma cruzi	62
3.5.3	Marcação DNA e Leitura	62
3.6	PCR	63
3.7	PCR de Colônia	64
3.8	Construção	64
3.8.1	pJET-123bp repeat ORI1	64
3.8.2	pMal-TcMcm7	65
3.9	Bactérias Competentes	66
3.9.1	Preparo de Bactérias Termocompetentes (Escherichia coli)	66
3.9.2	Transformação de Bactérias Competentes por Choque Térmico	66
3.10	Lise Alcalina	66
3.11	TcMcm7 recombinante	67
3.11.1	Expressão Pequena Escala	67
3.11.2	Expressão Larga Escala	68
3.11.3	Lise	68
3.11.4	Purificação rTcMcm7-MBP	69
3.11.5	5Anti-TcMcm7	69

		69
3.13	Extrato Total	71
3.14	Extrato Diferencial	71
3.15	SDS PAGE	72
3.15.1	1 Preparação do Gel de acrilamida/bisacrilamida	72
3.15.2	2 Corrida e Transferência Gel de Acrilamida	73
3.16	Immunoblotting	73
3.17	FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)	74
3.17.1	1 Marcação da Sonda	74
3.17.2	2 Lâmina	75
3.18	Imunofluorescência	76
3.19	Imunoprecipitação de Cromatina (<i>ChIP</i>)	77
3.19.1	1 Obtenção da Cromatina	77
3.19.2	2 Imunoprecipitação da Cromatina	77
3.19.3	3 Purificação do DNA com fenol/clorofórmio	78
3.19.4	4 Hibridização com Sondas de DNA	78
3.20	SMARD	79
3.20.1	1 Incorporação de Análogos de Timidina	79
2 20 2	Proportação do plugo poro Pulsod Field Electropherecia Col (pro	
3.20.2	rieparação de plugs para ruised rield Electrophoresis Gei (pro -	
3.20.2 da luz	z Preparação de plugs para Pulsed Pielo Electrophoresis Gel (pro z)	00000000000000000000000000000000000000
3.20.2 da luz 3.20.3	2 Preparação de plugs para Puísed Pield Electrophoresis Gel (pro z) 3 Digestão do DNA em plugs de agarose (protegido da luz)	79 80
3.20.2 da luz 3.20.3 3.20.4	z Preparação de plugs para Puísed Pield Electrophoresis Gel (pro z) 3 Digestão do DNA em plugs de agarose (protegido da luz) 4 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)- (protegido da luz)	79 80 80
3.20.2 da luz 3.20.3 3.20.4 3.20.5	2 Preparação de plugs para Puísed Pield Electrophoresis Gel (pro z) 3 Digestão do DNA em plugs de agarose (protegido da luz) 4 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)- (protegido da luz) 5 Southern Blotting	79 80 80 82
3.20.2 da luz 3.20.3 3.20.4 3.20.5 3.20.6	2 Preparação de plugs para Puísed Pield Electrophoresis Gel (pro z) 3 Digestão do DNA em plugs de agarose (protegido da luz) 4 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)- (protegido da luz) 5 Southern Blotting 6 Encontrando o fragmento alvo	79 80 80 82 83
3.20.2 da luz 3.20.3 3.20.4 3.20.5 3.20.6 3.20.6	2 Preparação de plugs para Puísed Pield Electrophoresis Gel (pro z) 3 Digestão do DNA em plugs de agarose (protegido da luz) 4 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)- (protegido da luz) 5 Southern Blotting 6 Encontrando o fragmento alvo 7 Recuperando o DNA do PFGE (protegido da luz)	5769100 79 80 80 82 83 83
3.20.2 da luz 3.20.3 3.20.4 3.20.5 3.20.6 3.20.7 3.20.8	2 Preparação de plugs para Puísed Pield Electrophoresis Gel (pro z) 3 Digestão do DNA em plugs de agarose (protegido da luz) 4 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)- (protegido da luz) 5 Southern Blotting 5 Southern Blotting 6 Encontrando o fragmento alvo 7 Recuperando o DNA do PFGE (protegido da luz) 8 Preparação das lâminas	5769100 79 80 80 82 83 83 84 85
3.20.2 da luz 3.20.3 3.20.4 3.20.5 3.20.6 3.20.7 3.20.8 3.20.8	2 Preparação de plugs para Puísed Pield Electrophoresis Gel (pro z) 3 Digestão do DNA em plugs de agarose (protegido da luz) 4 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)- (protegido da luz) 5 Southern Blotting 6 Encontrando o fragmento alvo 6 Encontrando o DNA do PFGE (protegido da luz) 7 Recuperando o DNA do PFGE (protegido da luz) 8 Preparação das lâminas 9 Esticando DNA sobre a lâmina (protegido da luz)	5769100 79 80 82 82 83 83 84 85 85
3.20.2 da luz 3.20.3 3.20.4 3.20.5 3.20.6 3.20.7 3.20.8 3.20.9 3.20.9	2 Preparação de plugs para Puísed Pield Electrophoresis Gel (pro z) 3 Digestão do DNA em plugs de agarose (protegido da luz) 4 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)- (protegido da luz) 5 Southern Blotting 6 Encontrando o fragmento alvo 6 Encontrando o DNA do PFGE (protegido da luz) 7 Recuperando o DNA do PFGE (protegido da luz) 8 Preparação das lâminas 9 Esticando DNA sobre a lâmina (protegido da luz) 10 Fixação e desnaturação (protegido da luz)	5769/100 79 80 82 82 83 83 85 85 86
3.20.2 da luz 3.20.3 3.20.4 3.20.5 3.20.6 3.20.6 3.20.6 3.20.9 3.20.1 3.20.1	2 Preparação de plugs para Puísed Pield Electrophoresis Gel (pro z) 3 Digestão do DNA em plugs de agarose (protegido da luz) 4 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)- (protegido da luz) 5 Southern Blotting 6 Encontrando o fragmento alvo 6 Encontrando o fragmento alvo 7 Recuperando o DNA do PFGE (protegido da luz) 8 Preparação das lâminas 9 Esticando DNA sobre a lâmina (protegido da luz) 10 Fixação e desnaturação (protegido da luz) 10 Fixação e desnaturação (protegido da luz) 11 Hibridização, Lavagem e Detecção	5769100 79 80 80 82 83 83 85 85 85 85 86 87
3.20.2 da luz 3.20.3 3.20.4 3.20.5 3.20.6 3.20.7 3.20.8 3.20.9 3.20.1 3.20.1 3.20.1	2 Preparação de plugs para Puísed Pield Electrophoresis Gel (pro z) 3 Digestão do DNA em plugs de agarose (protegido da luz) 4 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)- (protegido da luz) 5 Southern Blotting 6 Encontrando o fragmento alvo 7 Recuperando o DNA do PFGE (protegido da luz) 8 Preparação das lâminas 9 Esticando DNA sobre a lâmina (protegido da luz) 10 Fixação e desnaturação (protegido da luz) 10 Fixação e desnaturação (protegido da luz) 11 Hibridização, Lavagem e Detecção 12 Aquisição de Imagens	5769/100 79 80 80 82 82 83 83 85 85 85 85 86 87 89
3.20.2 da luz 3.20.3 3.20.4 3.20.5 3.20.6 3.20.7 3.20.6 3.20.7 3.20.8 3.20.1 3.20.1 3.20.1 3.20.1 3.20.1	2 Preparação de plugs para Puísed Pielo Electrophoresis Ger (pro z)	5769/100 79 80 80 82 82 83 83 85 85 85 85 85 85 87 89 90
3.20.2 da luz 3.20.3 3.20.4 3.20.5 3.20.6 3.20.7 3.20.8 3.20.9 3.20.1 3.20.1 3.20.1 3.20.1 4 RE 4.1	2 Preparação de plugs para Puísed Field Electrophoresis Gel (pro z)	5769/100 79 80 80 82 82 83 83 85 85 85 85 87 89 90 90
3.20.2 da luz 3.20.3 3.20.4 3.20.5 3.20.6 3.20.7 3.20.8 3.20.1 3.20.1 3.20.1 3.20.1 4 RE 4.1 4.1.1	2 Preparação de plugs para Pulsed Field Electrophoresis Gel (pro z)	bieglido 79 80 80 81 82 83 83 84 85 85 85 85
3.20.2 da luz 3.20.3 3.20.4 3.20.5 3.20.6 3.20.7 3.20.6 3.20.7 3.20.1 3.20.1 3.20.1 3.20.1 4 RE 4.1 4.1.1 4.1.2 celula	2 Preparação de plugs para Pulsed Field Electrophoresis Gel (pro z) 3 Digestão do DNA em plugs de agarose (protegido da luz) 4 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)- (protegido da luz) 5 Southern Blotting	bieglido 79 80 80 81 82 83 83 84 85 85 85

4.1.4 TcOrc1/Cdc6 e TcPCNA são expressas nas diferentes formas do ciclo de vida de T. cruzi, enquanto TcMcm7 é expressa apenas nas formas replicativas
4.1.5 TcOrc1/Cdc6, TcMcm7 e TcPCNA estão ligadas ao DNA apenas nas formas replicativas
4.2 Perfil da replicação da região central do cromossomo I de Trypanosoma brucei
4.2.1 A técnica de SMARD
4.2.2 SMARD em Trypanosoma brucei
4.2.2.1 Incorporação IdU e CidU
4.2.2.2 Isolando o cromossomo I
4.2.2.3 Esticando cromossomo I sobre a lâmina102
4.2.2.4 Fragmento de 347 kb do cromossomo I de T. brucei
4.2.2.5 Amplificação e marcação das sondas104
4.2.3 Fragmento de 347 kb da região central do cromossomo I de T. brucei 107
4.2.4 Identificação de uma nova origem de replicação no cromossomo I de T. brucei
4.2.5 TbOrc1/Cdc6 liga ORI 1 in vivo
4.2.6 Região do centrômero replica antes de ORI 1
4.2.7 ORI 1 é uma origem de replicação late
4.2.8 A velocidade da forquilha de replicação nas diferentes formas de vida de T. brucei é similar
5 DISCUSSÃO
5.1 Controle da replicação do DNA em <i>T. cruzi</i>
5.2 Dinâmica das forquilhas de replicação em <i>T. brucei</i> 126
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS130
REFERÊNCIAS

1 INTRODUÇÃO

O ciclo celular é a base da vida. O organismo vivo é dependente de sucessivas etapas de crescimento, que incluem duplicação de seu material genético e divisão celular para poder perpetuar-se. A replicação neste contexto é fundamental para garantir a fidelidade das células filhas à mãe, assim uma cópia fidedigna de DNA deve ser alcançada a cada novo ciclo celular.

Diversas proteínas estão envolvidas na progressão das diferentes fases do ciclo celular como as ciclinas e CDKs, e no momento da replicação do DNA não é diferente. Muitas proteínas são responsáveis por iniciar a replicação, reparar seus erros e evitar que o material genético seja duplicado mais de uma vez.

Entender a replicação em organismos menos complexos e mais distantes na cadeia evolutiva nos permite ter um vislumbre de como a complexidade de eventos de organismos superiores tomou forma durante o processo evolutivo.

1.1 Ciclo Celular: Ciclinas e CDKs

O ciclo celular é composto por quatro fases subsequentes: G1 (*Gap*1), S (Síntese de DNA), G2 (*Gap*2) e mitose (M). A sua progressão é regida pela ação de diferentes combinações de ciclinas-CDKs (cy*clin dependent kinase*).

CDKs são quinases específicas de resíduos de serina/treonina que possuem expressão constante durante o ciclo celular, sendo direcionada para seus alvos específicos através da sua interação com as diferentes ciclinas que variam sua expressão durante as fases do ciclo celular. O complexo ciclina-CDK funciona de forma que a ciclina desempenhe função regulatória e a CDK função catalítica. As principais famílias das ciclinas envolvidas no controle do ciclo celular são as ciclinas A, E e D. Já as principais CDKs são CDK 1,2,4 e 6. (1).

1.1.1 Transição G1/S

Células em G1 podem prosseguir para fase S a fim de concluir mais um ciclo celular, ou podem permanecer em G0. A decisão de entrar ou não em S vai depender dos estímulos externos recebidos por esta célula. Esse ponto de decisão

de entrar ou não em S é chamado de ponto de restrição (*restriction point* ou *START* em leveduras) e uma vez que a célula passa desse ponto ela se torna independente de sinais mitogênicos externos para concluir o ciclo celular (2).

A principal proteína responsável em promover a passagem das células pelo ponto de restrição é a retinoblastoma (pRB). Sinais mitogênicos externos desencadeiam vias de sinalização intracelular, como a via MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), que irão ativar a transcrição de ciclinas do tipo D (3) que juntamente com as CDKs 2 e 4 (Figura 1.1) irão promover a fosforilação em diferentes sítios da pRB.

Em seu estado hipofosforilado a pRB inibe o fator de transcrição da família E2F, porém após sua hiperfosforilação ocorre a dissociação de pRB à E2F e este irá promover a transcrição de genes responsáveis pela progressão celular para a fase S (4).

Ciclinas do tipo E também desempenham papel na progressão de G1/S. Ao final de G1 a atividade de ciclina D-CDKs 4 e 6 decai e há aumento da atividade de ciclina E-CDK2 (Figura 1.1). O fator de transcrição da família E2F é responsável por sua transcrição, desta forma há um pico de expressão de ciclinas do tipo E na transição G1/S. CDK2-ciclina E também fosforilam pRB, sendo esta uma via de *feedback* positivo na inibição de pRB e promoção da transcrição por E2F (5).

A inibição de ciclinas E não impede a entrada de células em G1 para S, porém a proliferação celular torna-se mais lenta e também há a diminuição da resposta celular a estímulos mitogênicos (6). Já a superexpressão de ciclinas E tem sido frequentemente observada em vários tipos de câncer com agressividade tumoral aumentada (5) mostrando assim a sua relevância na transição G1/S.

1.1.2 Progressão S/G2 e G2/M

No início da fase S a ciclina E é degradada permitindo assim a formação do complexo ciclina A-CDK2, que irá propiciar a progressão da fase S até a entrada de G2. A atividade de CDK2 diminui na metade de G2 e ciclina A passa a interagir com CDK1. Ao final de G2 CDK1 complexa-se com ciclina B (Figura 1.1) que irá comandar a entrada da célula em mitose (M), uma vez que este complexo irá fosforilar diversos alvos envolvidos na ruptura do envelope nuclear, condensação

cromossômica, segregação e citocinese. A degradação de ciclina B subsequente à citocinese indica o início da próxima fase G1 (7).





Ciclina D-CDK4/6 e ciclinaE-CDK2 promovem a fosforilação de pRB liberando E2F para transcrição dos genes que irão permitir a entrada da célula em S. Ao final de G2 é o complexo ciclina B-CDK1 que irá permitir a entrada da célula em mitose e sua subsequente citocinese (2).

1.2 Complexo de Pré-Replicação

A replicação do DNA ocorre durante a fase S do ciclo celular e seu controle também é coordenado pela ação de CDKs e DDKs (*DBF4 Dependent Kinase* em leveduras)(8). Porém antes que a duplicação do DNA se inicie nesta fase, um complexo de pré-replicação (CPR) deve ser estabelecido sobre as origens de replicação no DNA.

As origens de replicação são sequencias de DNA na qual a replicação irá iniciar. Em bactérias e leveduras a sequência dessas origens é conhecida (9, 10), porém em eucariotos superiores não foi encontrada sequência específica para essas origens de replicação, estando essas associadas ao estado de abertura da cromatina em virtude dos eventos que a envolvem, como a transcrição por exemplo (11). As proteínas responsáveis em reconhecer as origens de replicação e formar o CPR são similares de bactérias a eucariotos superiores, porém conforme aumenta a complexidade celular há também o aumento da complexidade do CPR como será mostrado a seguir.

1.2.1 Bactérias

O pequeno genoma de bactérias, de aproximadamente 4 Mpb (12) em *Escherichia coli* por exemplo, é replicado a partir de uma única origem de replicação chamada OriC. Esta origem de replicação corresponde a 245 pares de bases (bp) composta por pequenas regiões de sequencias repetitivas (13).

Para iniciar a replicação a proteína DnaA reconhece e se liga a regiões ricas em AT de OriC, denominadas de *DnaA boxes*. DnaA inicia a abertura da dupla fita de DNA em seguida DnaC, que irá estabilizar o DNA simples fita, carrega para a origem DnaB que tem atividade de helicase e irá promover a abertura da dupla de DNA. Neste momento há interação transiente da primase com DnaB que sintetiza o *primer* de RNA e em seguida a holoenzima DNA polimerase III continua a polimerização das fitas de DNA a partir do *primer* recém sintetizado, concluindo a duplicação desse material genético (14).

Nestes procariotos a velocidade da forquilha de replicação é alta, sendo de aproximadamente 60kb/min. Por apresentar uma estrutura do DNA mais acessível e possuir sua replicação acoplada à transcrição de modo que ambas se movimentam na mesma direção ocorrendo menos encontros entre estas maquinarias, é possível duplicar seu material genético em tal velocidade, permitindo assim um curto ciclo celular que dura não mais de 30 minutos. Porém a fidelidade da cópia gerada é muito menor quando comprado a eucariotos superiores (15).

1.2.2 Leveduras e Metazoários

1.2.2.1 Origens de Replicação Específicas

Com material genético maior que o presente em bactérias, sendo cerca de 12Mpb em leveduras e 3000Mbp em Humanos, e velocidade da forquilha de replicação é menor (aproximadamente 2kb/min em leveduras (16)] e 2-3kb/min em humanos (15)]) o início da replicação ocorre em múltiplas origens para poder permitir a duplicação do material genético dentro do "prazo" da fase S.

Em Saccharomices cerviseae as origens de replicação são conhecidas como ARS (*autonomously replicating sequence*) que correspondem a sequências de DNA de poucas centenas de pares de bases (17), do qual o consenso de 11pb A/TTTTAT/CA/GTTTA/T (18) é essencial para que ocorra o reconhecimento por ORC (Origin Replication Complex), que são as primeiras proteínas do CPR que chegam ao DNA. Já em *S. pombe* não há sequência consenso, mas sim sequências ricas em AT que funcionam como origem de replicação (19).

Em metazoários não há sequência específica para a determinação de uma origem de replicação, mas sim diversos fatores que podem determinar em que locais a replicação será iniciada (20).

1.2.2.2 Proteínas do Complexo de Pré-Replicação

Apesar de não haver consenso quanto uma sequência específica de origem de replicação entre os eucariotos, as proteínas que formam o CPR são muito conservadas desde leveduras até humanos. Assim, antes do início efetivo da replicação do DNA em S, o complexo de pré-replicação precisa ser montado e isso acontece na transição das fases M/G1.

Primeiramente um complexo formado por seis subunidades denominado *Origin Recognition Complex* de 1 a 6 (ORC₁₋₆) se liga a origem de replicação e recruta outras duas proteínas Cdc6 (*Cell Division Cycle*) e Cdt1 (*Cdc10-dependent transcript factor 1*). Esta última recruta outro complexo formado por seis proteínas, MCM₂₋₇ (Mini Chromosome Manteinance de 2 a 7) à origem de replicação. Neste ponto tem– se formado o complexo de pré-replicação (ORC ₁₋₆, Cdc6, Cdt1 e MCM ₂₋₇/Figura 1.2 A) que permanece ligado ao DNA durante toda a fase G1 (21) e que será ativado apenas na fase S.

O complexo MCM ₂₋₇ que chega por último na formação do complexo de préreplicação é constituído por seis proteínas que são as Mcm2 a Mcm7. Este complexo, que possui forma de anel e apresenta atividade de helicase, envolve DNA dupla fita (22) e tem por função abrir a dupla fita de DNA para que este possa ser duplicado por ação das DNA polimerases (21, 23). Tem-se observado que as MCMs são indispensáveis no processo de replicação, pois quando são inibidas na fase S há uma abrupta interrupção da síntese de DNA (24, 25).

O recrutamento do complexo MCM 2-7 para formar o CPR é dependente de Cdc6 e Cdt1. Este último interage fisicamente a componentes do complexo MCM 2-7, direcionando-o ao DNA onde ORC e Cdc6 já estão ligados (Bell e Dutta, 2002). Estudos com mutantes de Cdc6 no sítio de ATPase mostraram que há aumento de Cdt1 e diminuição de MCM₂₋₇ ligada à cromatina, evidenciando também um importante papel de Cdc6 no recrutamento das MCMs (26).

Figura 1.2- Complexo de Pré-Replicação em Eucariotos e Arhaea.





1.2.3 Archaea

Entre eucarioto e bactéria está situada a archaea na cadeia evolutiva (Figura 1.3), com características similares tanto de bactéria como de eucariotos.



Figura 1.3- Árvore filogenética da vida: bactéria, archaea e eucarioto.

Estes procariontes apresentam um único cromossomo que pode apresentar uma ou mais origens de replicação que são sequências ricas em AT (até 80%) (28). Dentre as diferentes espécies de archaea existem algumas que apresentam proteínas similares à ORC de eucariotos, porém na maioria das espécies a origem de replicação é reconhecida por uma proteína ORC/CDC6 que possui similaridade tanto à Orc1 quanto à Cdc6. Uma vez ligada à origem esta proteína é capaz de recrutar o hexâmero MCM que possui atividade de helicase, e nestas células o complexo MCM é formado por 7 monômeros (Figura 1.2 B). Assim o complexo de replicação em archaea é formado apenas por ORC/CDC6 e MCM (29).

Acredita-se que estas proteínas, ORC/CDC6 e MCM, foram as precursoras das proteínas do CPR de eucariotos. Assim, tanto as subunidades de ORC quanto do complexo MCM2-7 surgiram por duplicação e divergência gênica desses precursores em archaea (20, 30).

1.3 Replicação do DNA em Eucariontes

Após a formação dos complexos de pré-replicação na transição M/G1, ocorre a ativação desses complexos na entrada de S para que a replicação seja efetivamente iniciada. Assim as proteínas quinases CDKs de fase S (ciclina E-CDK2 e ciclinaA-CDK2) e também CDC7-DBF4 (em leveduras) desempenham importante função neste processo de ativação por meio de fosforilação de subunidades de MCM2-7, liberação de CDC6 e recrutamento de MCM10. CDKs também fosforilam as proteínas SLD2 e SLD3 que resulta na formação do complexo SLD2-SLD3-DPB11 (TopBP1) que juntamente com MCM10 recrutam CDC45. O complexo SLD2-SLD3-DPB11 também desempenha importante função no recrutamento do complexo GINS (formado por 4 proteínas: SId5, Psf1, Psf2 e Psf3) (20, 31).

CDC45, MCM2-7 e GINS, conhecido como complexo CMG, tem a função de helicase, permitindo a abertura da dupla fita de DNA. De fato MCM2-7 é a principal responsável pela atividade de helicase, tendo CDC45 e GINS função ativadora dessa atividade em MCM2-7(32).

A partir da abertura da dupla fita de DNA a proteína RPA (*Replication Factor A*) se liga ao DNA simples fita pra estabiliza-lo e então a DNA polimerase α -primase interage com CDC45 e sintetiza um *primer* de RNA. A dupla fita DNA-RNA formada possibilita o recrutamento de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) por meio da ação de RFC (*Replication Factor C*)(32, 33).

PCNA é um monotrímero em forma de anel que envolve a dupla fita de DNA e funciona como plataforma de ancoragem para demais proteínas envolvidas na replicação do DNA. Desta forma a DNA polimerase α -primase é substituída pelas DNA polimerases δ (delta) e ϵ (épsilon) que irão prosseguir com a formação na nova fita de DNA (33).



Figura 1.4- Ativação do Complexo de Pré-Replicação e início da síntese da nova fita de DNA.

O Complexo de Pré-Replicação (aqui pre-RC) formado na transição M/G é ativado em S por CDKs e DDK que promovem o recrutamento de CDC45 e GINS formando o complexo CMG (CDC45-MCM2-7-GINS) que tem atividade de helicase. Este complexo abre a dupla fita de DNA permitindo seu acesso às DNAs polimerase a demais proteínas envolvidas na replicação do DNA (20).

1.3.1 Controle da Replicação

A duplicação do DNA é um passo crucial no ciclo celular e para garantir que apenas uma cópia desse material genético seja obtida é necessário um rígido controle sobre as proteínas do CPR, evitando que uma mesma origem de replicação seja disparada mais de uma vez no mesmo ciclo celular.

Como já dito anteriormente as ciclinas-CDKs apresentam um importante papel na regulação da replicação. Enquanto a formação do CPR só é possível em M/G1 quando há baixa atividade das CDKs, é na fase S de alta atividade de CDKs que ocorre tanto a ativação como a desmontagem do CPR. Assim quando a célula entra na fase S não é mais possível a formação de novos complexos de pré-replicação,

além dos diferentes mecanismos de controle sobre cada proteína desse complexo (21).

1.3.1.1 ORC 1-6

Em Saccharomyces cerevisiae ORC permanece ligado à cromatina durante todo ciclo celular, porém durante a transição da fase G1 para S as subunidades Orc1, Orc2 e Orc6 são fosforiladas pelo complexo CDK1/Clb. A fosforilação de ORC por CDK impede o recrutamento das demais proteínas do complexo de pré-replicação, prevenindo a formação deste complexo fora de M/G1. No início de G1 ORC é desfosforilada para que ocorra a montagem de novos complexos de pré-replicação (34).

Em mamíferos o controle da atividade de ORC parece estar concentrado em Orc1, uma vez que as Orcs de 2 a 6 permanecem ligadas à cromatina durante o ciclo celular. Na fase S, no entanto, Orc1 é ubiquitinada e sob algumas condições é degradada. Apenas na transição da fase M para G1 de um novo ciclo a Orc1 será resintetisada para que o complexo de pré-replicação possa voltar a se formar (revisado em DePamphilis, 2003).

1.3.1.2 Cdc6

A ligação de Cdc6 à ORC é um passo importante na formação do complexo de pré-replicação (Liang et al, 1995) e essencial para a chegada das MCMs (Donovan et al, 1997). A atividade de CDK inibe a chegada de Cdc6 ao DNA para a formação do complexo de pré-replicação por meio de diferentes ações. Em levedura CDK fosforila Cdc6, na fase S, que é então ubiquitinada e degradada (Drury et al, 1997), além de fosforilar o fator de transcrição que deixa de entrar no núcleo e não transcreve novas moléculas de Cdc6. Já quando a célula entra na fase M as moléculas de Cdc6 recém-sintetizadas são fosforiladas pela CDK1-ciclina B, impedindo que se ligue à ORC até que a mitose termine. Em células humanas Cdc6 é fosforilada e exportada do núcleo durante a fase S, permanecendo no citoplasma durante as fases G2 e M (Jiang et al 1999) e na transição das fases M e G1 é degradada para ser resintetizada na fase G1 (Mendez & Stillman, 2000).

1.3.1.3 Cdt1 e MCM 2-7

Cdt1 interage com componentes do complexo MCM 2-7 levando-o para se ligar ao DNA, assim uma das formas de evitar a re-replicação é impedir que as MCMs liguem-se a Cdt1 e, portanto, cheguem ao DNA.

Em metazoários a principal via de controle da re-replicação é por meio da diminuição da atividade de Cdt1. Ao final de G1 e início de S parte das moléculas de Cdt1 são fosforiladas por CDK, em seguida ubiquitinadas e então degradadas. Ainda outra parte das moléculas de Cdt1 podem se ligar a geminina que impede sua degradação, mas também sua interação com as MCMs. A ligação Cdt1-geminina permanece até o final da fase M quando geminina é degradada, permitindo a liberação de Cdt1 para formação de novos complexos de pré-replicação. Nestes organismos MCM permanece no núcleo, e a sua regulação para interagir ou não com o DNA fica sendo dependente da disponibilidade de Cdt1 livre (que só ocorre ao final de M e início de G1). Leveduras, entretanto, não possuem geminina, portanto a regulação passa a ser por meio de exportação do núcleo para o citoplasma de Cdt1 e MCMs durante as fases S, G2 e início de M após fosforilação por CDKs (revisado em Blow & Dutta, 2005).

Figura 1.5- Controle da replicação.



O complexo de pré-replicação é formado exclusivamente na transição das fases M/G1. Após sua ativação pela CDK e DDK, este complexo é desfeito para impedir que uma mesma origem seja disparada mais de uma vez na mesma fase S. Assim em metazoários pode ocorrer degradação de Cdt1 ou seu sequestro pela proteína geminina. Também pode ocorrer a exportação do núcleo de Cdc6. (35)

1.4 Origem de Replicação

Apesar de diversos esforços na busca por uma sequência consenso de origem de replicação em eucariotos superiores, nada foi encontrado até agora. Porém, mais que uma sequência de DNA específica, tem-se descoberto que a arquitetura da cromatina é um ponto chave no estabelecimento das forquilhas de replicação (36). Assim a facilidade de acesso da cromatina pode ajudar a determinar as origens de replicação, além de também poder estabelecer em que momento da fase S cada origem será disparada (37).

1.4.1 Estutura da Cromatina

Para comportar uma enorme quantidade de DNA no espaço nuclear este precisa ser compactado, ficando esta função para as histonas. Desta forma um *core* de histona típico é constituído por 8 histona, 2 de cada tipo (H2A, H2B, H3 e H4),que juntamente com cerca de 145pb envolvidos neste *core* formam o nucleossomo. Os diversos nucleossomos estão conectados por um curto DNA (*DNA linker*) e a estrutura de nucleossomos e DNA *linker* compõem as fibras de 10nm (estrutura primária da cromatina; Figura 1.6).

Porém as histonas podem sofrer diferentes tipos de modificações, tais como metilação e acetilação, além de existirem algumas variantes de histona que podem afetar a estrutura primária da cromatina, aumentando ou diminuindo seu acesso (38).



Figura 1.6- Nucleossomo e a estrutura da cromatina.

Nature Reviews | Molecular Cell Biology
O nucleossomos são formados por 4 tipos de histonas canônicas: H2A, H2B, H3 e H4. Também pode haver participação de algumas histonas variante que irão interferir na acessibilidade da cromatina. A compactação dos nucleossomos juntamente com a ação de outras proteínas formam as fibras de 30nm, que se compactam ainda mais formando a estrutura de cromatina terceária (38).

As fibras de 10nm são organizadas tridimensionalmente de forma a criar a fibra de cromatina de 30nm (estrutura secundária da cromatina). Ainda não está bem definido como estas fibras são formadas e ainda se questiona se realmente existe essa formação da cromatina *in vivo* (39-41). Contudo a cromatina ainda pode ser compactada em um nível maior (estrutura terceária), onde a histona H1 se liga aos nucleossomos e ao DNA *linker* aproximando os nucleossomos de forma a estabilizar esta estrutura da cromatina (42).

O DNA chega a ser compactado cerca de 10 a 20 mil vezes, mas ainda assim deve permitir que proteínas envolvidas na replicação e transcrição tenham acesso a ele (43). Desta forma, esses processos nucleares têm sido intimamente relacionados, uma vez que a acessibilidade ao DNA é algo em comum para transcrição e replicação (11).

1.4.2 Origens de Replicação Early e Late

Outro aspecto das células apresentarem um grande genoma é que a duplicação de tamanho material genético é confinada a um curto espaço de tempo. Se o genoma humano, por exemplo, apresentasse apenas uma origem de replicação a sua duplicação levaria cerca de 20 dias (15). Por isso há múltiplas origens de replicação ao longo do genoma, porém nem todas as origens são disparadas. Em leveduras a eficiência de disparo é menor que 50% (44, 45), já em metazoários a eficiência cai para 5 a 20% (46, 47). E estas origens disparadas podem o ser em diferentes momentos da fase S, caracterizando assim origens de replicação *early* e *late*, que são origens disparadas no início e mais tardiamente em S, respectivamente.

1.4.2.1 Metazoários

Em metazoários o momento de disparo das origens de replicação tem sido muito relacionado com a transcrição, de forma que em geral genes altamente transcritos são replicados no começo da fase S (origem *early*) enquanto que genes silenciados são replicados mais tarde (48). Várias origens de replicação conhecidas estão localizadas em regiões intergênicas próximas a regiões promotoras (49, 50) e genes

altamente transcritos tendem a estar próximos de origens de replicação (51, 52). E importante ressaltar que enquanto as origens de replicação estão localizadas perto de regiões de início de transcrição, não há necessidade de a transcrição estar ocorrendo para que a origem seja ativada (53).





Genes altamente expressos tendem a ser replicados no inicio de S enquanto genes pouco expressos ou silenciados tendem a ser replicados ao final de S (37).

Um bom exemplo da correlação entre transcrição e replicação é o *locus* da β globulina em células eritróides que sintetizam altas quantidades de hemoglobina. Em uma linhagem de células eritroleucêmicas humanas, a expressão de β -globulina é dependente de uma região LCR (*locus control region*) à 20kb *upstream* que contém sítios de ligação para fatores de transcrição. Mesmo estando distante dessa, LCR é importante para o início da replicação, uma vez que deletada a iniciação na origem de replicação da β -globulina é abolida (54).

Origens *early* tendem a se localizar em regiões de cromatina mais aberta e acessível, onde há presença de histonas acetiladas e altos níveis de dimetilação e trimetilação em H3K4 (lisina 4 da histona H3) (55). Igualmente, origens de replicação que apresentam ilhas CpG não metiladas em suas proximidades são replicadas primeiro que aquelas cujas ilhas CpG estão metiladas (56).

Ainda mais, fatores de transcrição estão envolvidos na ativação de origens de replicação. Em *Drosophila*, por exemplo, o complexo pRb-E2F regula a ativação das origens de replicação através de interação indireta com ORC (57). Já o fator de transcrição c-Jun, que possui sítios de ligação enriquecidos em regiões próximas à origem de replicação em células humanas, pode ativar a replicação do polioma vírus estimulando a ligação do seu iniciador de replicação à origem (58).

Portanto acredita-se que relação entre o nível de transcrição e o momento da replicação ocorra principalmente devido à questão de acesso à cromatina, já que ambos os processos dependem desse acesso para serem realizados e que origens *early* se encontram próximas a genes altamente transcritos, onde a cromatina é mais aberta (11, 59).

1.4.2.2 Leveduras

Em leveduras (*S. cereviseae*) também são encontradas origens *early* e *late*, porém não há correlação do momento de disparo da origem e o nível transcricional dos genes replicados (60). Nestas células as origens de replicação (ARS*autonomously replicating sequence*) são disparadas conforme seu posicionamento no cromossomo, de maneira que as ARSs que se encontram em região subtelomérica são replicadas tardiamente, enquanto as ARSs próximas ao centrômero são replicadas no início de S. Quando estas origens foram trocadas de lugar, ou seja, *early* ARS colocada em região subtelomérica e *late* ARS próxima ao centrômero, o padrão de replicação continuou o mesmo, na qual a ARS da região centromérica replicou primeiro e o da região subtelomérica tardiamente, indicando assim que existem sequencias de DNA que flanqueiam as *late* ARS que reprimem sua replicação precoce (Ferguson e Fangman, 1992).

Mas não apenas o posicionamento cromossômico determina ARS *early* e *late*, algumas proteínas essenciais para ativar os complexos de pré-replicação são limitantes, impedindo que mais origens sejam disparadas ao mesmo tempo. Assim o complexo CDC45-Sld3 é encontrado em baixos níveis e se associam com *early* ARS no início de S, e quando se encontram novamente disponíveis se associam com *late* ARS (61).



Figura 1.8- Fatores limitantes influenciam o momento do disparo de origens early e late.

Alguns fatores podem ser limitantes e determinantes para a ativação das diferentes origens. Assim origens *early* detêm estes fatores durante sua replicação que quando tornanse disponíveis irão ativar origens de replicação *late*, como é o caso de Cdc45 em leveduras (60).

Mais recentemente foram identificadas algumas proteínas que também atuam na regulação de origens *early* e *late*. Os fatores de transcrição Fkh1 e Fkh2 participam do momento de disparo da maioria das origens *early* e também de algumas origens *late*, uma vez que células sem Fkh1 e 2 apresentaram profundas mudanças no perfil de replicação do cromossomo, havendo atraso no disparo de algumas origens *early* e adiantamento de algumas origens *late* (62). Esse controle sobre o momento da replicação das origens é independente do papel de Fhk como fator de transcrição. Ainda outras duas proteínas ligadoras de telômero, Rif1 e Taz1, também foram identificadas com função de regulação de origens *early* e *late* em S. *pombe (63, 64)*.

1.4.3 Origens Dormentes

Uma vez que as origens de replicação podem ser licenciadas apenas na transição das fases M/G1, muitas origens são licenciadas, mas nem todas são ativadas na fase S. Assim das diversas origens de replicação, aquelas que não são disparadas são conhecidas como origens dormentes, que de forma geral são replicadas de forma passiva por origens adjacentes (65).

Diversos fatores podem acarretar no empacamento de uma forquilha de replicação, impedindo que esta prossiga momentaneamente ou até mesmo de forma irreversível. Assim uma forquilha de replicação pode encontrar em seu caminho impedimentos como proteínas ligadas fortemente ao DNA, bases modificadas ou quebras na fita de DNA. De um modo geral estes impedimentos são logo resolvidos e a replicação pode prosseguir, porém em casos de forquilhas de replicação que entrem em colapso irreversível, as origens dormentes são ativadas permitindo que o DNA termine de ser duplicado, evitando perda de material genético pela falta de duplicação em S (66), como ilustrado na figura 1.9.



Figura 1.9- Papel das origens de replicação dormentes.

Em (a) uma única forquilha empacada (fork stall) não acarreta problemas uma vez que um forquilha adjacente pode concluir a replicação, porém quando duas forquilhas adjacentes empacam (b) a região entre elas pode deixar de ser replicada, havendo perda de material genético. As origens dormentes servem para evitar esta perda de DNA, assim quando não há forquilhas empacadas (c) o complexo de pré-replicação e desfeito e a origem é passivamente replicada. Porém em casos de duas forquilhas adjacentes empacarem (d), a forquilha dormente é ativada e a replicação é concluída. O complexo de pré-replicação estão indicados apenas pelo complexo MCM, sendo as de cor rosa origens ativas e as de azul, origens dormentes (65).

O mecanismo que regula as origens dormentes permanece incerto, porém temse observado que há um aumento da densidade de origens de replicação em regiões do DNA na qual houve diminuição da velocidade da forquilha, indicando a ativação de origens dormentes nestas regiões (67-69). Assim as origens dormentes parecem ser um mecanismo que provê proteção na duplicação do DNA, ao mesmo tempo que minimiza os custos de usar um grande número de origens de replicação (66).

1.5 Trypanosomas

Na escala evolutiva os *trypanosomas* são eucariotos que divergiram muito cedo, tendo assim algumas peculiaridades como a transcrição policistrônica e a edição de RNA, por exemplo. Desta forma têm sido amplamente usado como modelo de estudos. Em nosso laboratório as espécies *Trypanosma cruzi* e *Trypanosoma brucei* têm servido de modelo no estudo tanto das maquinarias de pré-replicação quanto da replicação em si de seu material genético.

T. cruzi e *T. brucei* são endêmicas em diferentes continentes, atingindo milhões de pessoas principalmente em países pobres ou em desenvolvimento acarretando um grande impacto social, uma vez que muitos portadores têm suas capacidades de trabalho limitadas. Portanto entender estes organismos nos concede não apenas a possibilidade de ter um pequeno vislumbre do processo evolutivo, mas também de nos fornecer ferramentas que podem ser úteis na descoberta de novas drogas.

1.6 Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da Doença de Chagas que pode ser transmitido por 52 espécies de triatomíneos apenas no Brasil. Segundo a organização mundial da saúde, estima-se que cerca de oito milhões de pessoas no mundo estão infectadas com *T. cruzi.* As regiões endêmicas estão confinadas nas Américas atingindo desde a Argentina até o sul dos Estados Unidos (70).



Figura 1.10- Mapa das áreas endêmicas de Trypanosoma cruzi.

A doença de Chagas causada por este parasita apresenta uma fase de infecção aguda, onde o paciente pode não apresentar sintomas ou ainda sintomas leves como febre, dor de cabeça, dor muscular, dificuldade de respirar, inchaço e em menos de 50% dos casos é possível observar o primeiro sinal visível característico desta doença, que é uma lesão na pele ou um inchaço roxo em apenas uma das pálpebras. Já na fase crônica da doença até 30% dos pacientes desenvolvem desordem cardíaca e até 10% sofrem de alterações no sistema digestivo e/ou neuronal (dados OMS).

1.6.1 Ciclo de Vida

Durante seu ciclo de vida o *T. cruzi* apresenta diferentes estágios no hospedeiro vertebrado e no vetor invertebrado. São quatro as formas de vida que variam nestes organismos: amastigota e epimastigota, que são formas replicativas e não são capazes de infectar; tripomastigota e tripomastigotas metacíclicos que não se replicam, mas são infectivos.



Figura 1.11- Diferentes formas de *T. cruzi* durante seu ciclo de vida.

Amastigota e epimastigotas não são capazes de infectar, mas são formas replicativas enquanto tripomastigota e tripomastigota metacíclicos infectam, porém não replicam.

As formas tripomastigotas metacíclicas presentes no intestino do vetor triatomíneo são liberadas juntamente com as fezes e/ou urina durante o seu repasto sanguíneo (1 figura 1.12). Ao serem eliminados, os tripomastigotas metacíclicos alcançam o interior do hospedeiro através da lesão causada pela picada do vetor ou ainda pela mucosa através da própria ação do hospedeiro de levar a mão à picada e coçar ou colocar sua mão em contato com as mucosas de seu corpo. Na corrente sanguínea os tripomastigotas podem infectar diversos tipos celulares como macrófagos, células musculares e epiteliais (2 figura 1.12). Dentro destas células, estes se diferenciam em amastigotas que se multiplicam por fissão binária (3 figura 1.12) e então se diferenciam nas formas tripomastigotas, que são liberadas na após o rompimento da célula. As formas tripomastigotas podem então infectar novas células ou permanecer na corrente sanguínea (4 figura 1.12), quando podem ser ingeridas pelo vetor barbeiro durante seu repasto sanguíneo (5 figura 1.12). No estômago do vetor, tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas (6 figura 1.12) e após chegarem ao intestino se replicam (7 figura 1.12) e em seguida migram para o intestino posterior passando pelo processo de metaciclogênese, gerando assim as formas tripomastiotas metacíclicas (8 figura 1.12).



Figura 1.12- O ciclo de vida de Trypanosoma cruzi.

1.7 Trypanosoma brucei

T. brucei é o agente etiológico da doença do sono, transmitido pela mosca Tsetsé endêmico nos países africanos sub-Saara. São duas as principais subespécies de *T. brucei* que atingem estes países, *T.b. gambiense* e *T.b rhodesiense*. Sendo o primeiro responsável por 98% dos casos e o segundo por menos de 2% dos casos (figura 1.13).





A doença apresenta dois estágios, o primeiro quando o parasita se multiplica nos tecidos subcutâneos, sangue e linfa gerando os surtos de febre, dores de cabeça, dor nas juntas e coceira. No segundo estágio o parasita atravessa a barreira hematoencefálica, atingindo o sistema nervoso central causando: mudanças de comportamento, confusão, distúrbios sensoriais e distúrbios do sono. Sem tratamento esta doença e considerada fatal (dados OMS).

1.7.1 Ciclo de Vida

Durante seu ciclo de vida *Trypanosoma brucei* apresenta diferentes formas no seu vetor *Glossina morsitans*, a mosca Tsetsé, e no hospedeiro mamífero. Diferente de *T. cruzi* não apresenta formas intracelulares, mas possui formas replicativas e não replicativas. Assim a forma replicativa sanguícula, no hospedeiro mamífero, denominada de *slender* durante sua divisão gera as formas curtas que não são capazes de se dividir, *stumpy*, mas que são essenciais para infecção do vetor. Já as formas procíclicas replicativas, presentes no vetor, se diferenciam em formas metacíclicas capazes de infectar o hospedeiro mamífero (figura 1.14).



Figura 1.14- Formas replicativas e não replicativas de T. brucei.

Nature Reviews | Microbiology

Diferentes formas de vida de *Trypanosoma brucei* no: vetor inseto, onde estão presentes as formas procíclicas (replicaitva) e metacíclicas (não replicaitvas); hospedeiro mamífero na forma sanguícula replicativa (*slender*) e não replicativa (*stumpy*) (72).

Então durante o repasto sanguíneo a mosca Tsetsé infecta o hospedeiro mamífero com as formas tripomastigotas metacíclicas, presentes em sua saliva, que atingem a linfa e a corrente sanguínea, onde se diferenciam na forma tripomastigota sanguícula (*slender*) que se multiplicam nos fluidos corporais como sangue, linfa e até mesmo líquor. No processo de divisão são geradas as formas tripomastigotas sanguículas não replicativas *stumpy*, que são ingeridas pelo vetor em novo repasto sanguíneo. Estas se diferenciam em formas tripomastigotas procíclicas no intestino médio do vetor, onde se multiplicam. Ao deixar o intestino médio, estes se diferenciam em formas tripomastigotas que atingem a glândula salivar, multiplicam-se e diferenciam nas formas tripomstigotas metacíclicas que irão novamente infectar o hospedeiro mamífero, fechando o ciclo de vida.



Figura 1.15- Ciclo de vida de Trypanosoma brucei.

1.8 Ciclo celular em trypanosomas

As formas replicativas dos *trypanosomas* possuem ciclo celular que parecem também ser coordenado por ciclinas-CDKs. No genoma de *T. cruzi* foram identificadas 10 membros da família de CDKs (as *cyclin related kinases* - CRKs) e 10 ortólogos de ciclinas (as CYCs) (73), porém pouco se sabe sobre suas funções específicas durante o ciclo celular nesta espécie. Até agora foi descrita a participação de TcCYC2 no controle do ciclo celular, uma vez que a superexpressão diminuiu o tempo do ciclo e também foi constatado que esta proteína foi capaz de restaurar o ciclo celular de leveduras mutantes paradas em G1 (74). Quanto à função das CRKs, a CRK3 foi descrita com papel ainda não especificamente definido no controle do ciclo celular (75), em ambos os casos na forma epimastigota.

Já em *T. brucei* a caracterização do papel das CRKs e CYCs está mais adiantada. No genoma desta espécie foram encontradas 11 CRKs e 10 CYCs. Duas

destas CRKs (1 e 2) e quatro CYCs (2,4,5 e 7) apresentam importante papel na transição das fases G1/S , na qual CRK1 é capaz de interagir com CYC2,4,5 e 7, enquanto CRK2 interage apenas com CYC2(76-80). Na transição das fases G2/M as CRKs 3 e 9 e as CYCs 2,6 e 8 estão envolvidas. De forma que CRK 3 interage tanto com CYC2 e 6, enquanto CRK9 interage apenas com CYC2. O papel de CYC8 foi identificado em ensaios de RNA de interferência ocorrendo retardo na transição das fases G2/M, porém sua parceira CRK ainda não foi identificada (76-79, 81, 82).

Diferente das enzimas envolvidas no controle do ciclo celular, os eventos morfológicos que marcam cada fase e que permitem que células em cultura exponencial sejam identificadas conforme a fase do ciclo celular em que está já foi bem caracterizado, tanto em *T. cruzi* quanto em *T. brucei*. Nestas células a mitose é fechada, na qual o núcleo permanece integro, desta forma o número de núcleo, de cinetoplasto (que é o DNA de sua única mitocôndria) e de flagelos identifica em que fase do ciclo a célula está.

1.8.1 T. cruzi forma epimastigota

O ciclo celular da forma epimastigota descrito em (83), mostra que as formas epimastigotas levam 24 horas para se duplicar. Destas horas, apenas 10% representam a fase S de replicação do DNA, portanto sendo de 2,4h. As fases de intervalo G1 e G2 são as mais longas, sendo de 10,8 horas G1 e 8,6 horas G2.

Células que possuem um núcleo (N), um cinetoplasto (K) e um flagelo (F) caracterizam as fases G1 e S, a o surgimento do novo flagelo que ocorre apenas ao final da duplicação do DNA aponta para células entrando em G2, contendo portanto 1N1K2F. A segregação dos cinetoplastos ocorre pouco antes da divisão do núcleo e identificam células em mitose, que dura apenas 24 minutos, com 1N2K2F. A citocinese é marcada por células com o núcleo dividido quando então começa a divisão celular, processo que dura 1,8h e é caracterizado por células com 2N2K2F. As características morfológicas de cada fase celular estão ilustradas na figura 1.16.



Figura 1.16- O ciclo de celular da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*.

Fases do ciclo celular de 24h da forma epimastigota, na qual células com 1 núcleo (N), 1 cinetoplasto (K) e 1 flagelo (F) caracterizam células em G1 e S. Ao emergir o novo flagelo há indicação de células em G2 (1N1K2F) e após a segregação dos cinetoplastos as células atingem a fase M (1N2K2F). O núcleo se divide e as células entram em cintocinese (C) com 2N2K2F (83).

1.8.2 T. brucei forma procíclica

O ciclo celular da forma procíclica descrito (84) dura 8,5 horas, sendo as fases de intervalo G1 e G2 as mais longas com 3,4 horas e 1,87 horas, respectivamente. A fase S leva 1,5 horas, a mitose e citocinese duram 0,69 hora e 1,06 horas, respectivamente. Durante a progressão do ciclo celular diversos eventos morfológicos são observados, porém as que caracterizam as diferentes fases do ciclo celular estão representadas na figura 1.17.

Quando em G1 as células apresentam 1N1K1F e ao final desta fase ocorre o início da duplicação do DNA do cinetoplasto (kDNA). No início da fase S nuclear um novo flagelo surge, na metade de S o kDNA termina de ser duplicado, desta forma células em S apresentam 1N1K2F com cinetoplasto em divisão. A divisão do cinetoplasto termina em G2, assim células nesta fase apresentam 1N2K2F. Durante a mitose ocorre a segregação dos cromossomos e formação do fuso mitótico e a divisão nuclear, assim células que apresentam 2N2K2F já estão em M e seguirão para a citocinese.



Figura 1.17- O ciclo de celular da forma procíclica de *Trypanosoma brucei*.

O ciclo celular da forma procíclica de *T. brucei* dura 8,5 horas. Em (a) está indicado o tempo de cada fase do ciclo celular em relação a duplicação do DNA nuclear e do cinetoplasto. Em (b) estão os eventos morfológicos que marcam cada fase do ciclo celular (85).

1.8.3 Complexo de pré-replicação em trypanosomas

Durante a fase S ocorre a duplicação do material genético, sendo este iniciado nas origens de replicação. Nos trypanosomas as origens de replicação são licenciadas por um complexo de pré-replicação diferentes dos demais eucariotos. Em *T. cruzi* e *T. brucei* foi identificada uma proteína que é similar tanto a Orc1 quanto a Cdc6, que foi denominada de Orc1/Cdc6 (86) que reconhece as origens de replicação. Em *T. brucei* ainda foi encontrada uma segunda proteína semelhante à Orc1, denominada de Orc1b (87) que interage com Orc1/Cdc6, uma Orc4 like e outras duas proteínas que possuem pouca homologia com as sequências de ORC conhecidas (88). Nestas espécies não foram encontradas em análise *in silico* a proteína Cdc6 e nem Cdt1, porém todas as proteínas do complexo MCM2-7 estão presentes no genoma destes organismos (87).

Portanto não há um complexo ORC com as seis subunidades típicas como nos demais eucaritotos, mas sim uma proteína Orc1/Cdc6 que se liga a origem de replicação e é reconhecido por Orc1b. Quanto às outras proteínas homológas de ORC, ainda não foi descoberto papel na composição do complexo de pré-replicação. O recrutamento do complexo MCM2-7, na falta de Cdc6 e Cdt1, ocorre diretamente

via Orc1/Cdc6 e Orc1b através da ligação de Mcm3 com estas duas proteínas, assim como ocorre em archeae que também não possui Cdc6 e Cdt1, mas a subunidade de MCM interage diretamente com Orc1/Cdc6 deste organismo (89).

Portanto o complexo de pré-replicação em trypanosomas é constituído por: Orc1/Cdc6, Orc1b e MCM2-7 (Figura 1.18).

Figura 1.18- Complexo de pré-replicação em trypanosomas.



Em trypanosomas o complexo de pré-replicação é composto por Orc1/Cdc6 que reconhece a origem de replicação, Orc1b (em *T. brucei*) que interage com Orc1/Cdc6 e pelo complexo MCM2-7, cuja subunidade 3 (Mcm3) interage tanto com Orc1/Cdc6 quanto com Orc1b (em *T. brucei*).

1.8.4 Replicação do DNA e seu controle em trypanosomas

O complexo de pré-replicação formado é então ativado em S, porém não se sabe por meio de qual mecanismo, uma vez que não foram encontrados os genes referentes a Cdc7,Dbf4, Sld2 e Sld3. Contudo o complexo CMG está presente em trypanosomas. Enquanto que o complexo MCM2-7 por si só não apresenta atividade de helicase em trypanosomas, o complexo formado por Cdc45-MCM2-7 e GINS possue atividade de helicase neste organismo(87). Portanto ao entrar em S, Cdc45 e GINS são recrutados para as origens, abrindo a dupla fita de DNA e permitindo o seu acesso pelas proteínas da replicação, tais como RPA, PCNA (90, 91) e DNA polimerases que estão presentes nestes organismos. Quanto ao controle da replicação Orc1/Cdc6 parece não desempenhar uma função, pois permanece ligada ao DNA durante todo o ciclo celular de *T. cruzi* e *T. brucei* (86). Já o complexo MCM2-7 foi demonstrado estar presente no espaço nuclear durante todas as fases do ciclo celular em *T. brucei*, parecendo também não desempenhar papel no controle da replicação (87), porém não se sabe se há mudança da afinidade destas proteínas com o DNA durante o ciclo celular. Até o momento apenas a proteína Cdc45 parece desempenhar função no controle da replicação em *T. brucei*, uma vez que é expressa e se localiza no núcleo em todas as fases do ciclo, sendo exportada para o citoplasma durante a fase M (87).

1.8.5 Correlação entre transcrição e replicação em trypanosomas

A transcrição em trypanosomas ocorre de forma policistrônica, de maneira que *cluster* de cerca de 100 genes com função não relacionados são transcritos em um único policistron que é posteriormente processado em mRNA individuais maduros por meio de trans-splicing, com a adição de uma sequência líder (SL) na região 5`, e poliadenilação na região 3' (92, 93).

Nestes organismos foi encontrado sítio promotor de RNA polimerase II, que transcreve os mRNAs, apenas para a sequência líder (94), no demais a transcrição tem início em regiões divergente de policistrons e progridem de forma bidirecional (95), como indicado na figura 1.19 (*transcription start sites at divergent strand switch region*) e o término da transcrição ocorre em regiões convergente de policistrons (96) (figura 1.19 – *transcription termination site at convergent strand switch region*).



Figura 1.19- Regiões de início e terminação de transcrição.

Unidades de transcrição policistrônica em trypanosomas que podem ser convergentes, coincidindo com as terminações de transcrição, ou divergentes, onde se encontram a maioria dos sítios de início de transcrição. As setas verdes indicam o sentido da transcrição, e os blocos laranja indicam os genes presentes em cada *cluster* transcrito (97).

Os sítios de início da transcrição nas regiões de policistron divergentes têm sido correlacionados com a presença de histonas acetiladas na lisina 10 (H4K10ac), metilação na lisina 4 de histona H3 (H3K4met) e variantes de histonas H2A e H2B (98), além da presença da base J que também apresenta influência na transcrição (99). Já nas terminações de replicação, há um aumento das variantes de histonas H3 e H4 (98).

Recentemente foi realizado o mapeamento dos sítios de ligação de Orc1/Cdc6 ao longo dos 11 cromossomos de *T. brucei* e estas foram inferidas como sendo origens de replicação (100). Entretanto não foi encontrada nenhuma sequência consenso de origem de replicação, porém foi observado que os sítios de ligação de Orc1/Cdc6 coincidem em 70% com regiões de H4K10ac (100). Esta constatação aponta para a relação existente entre a replicação e a transcrição neste organismo. Ao que parece a ligação de Orc1/Cdc6 toma lugar em regiões de deposição de variantes de histonas e histonas modificadas que possuem nucleossomo mais flexível (98), como já tem sido observado em outros organismos onde a replicação tende a se iniciar em regiões de cromatina mais acessível como as regiões promotoras de transcrição (59, 60, 62).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- (A) Determinar o papel de proteínas da maquinaria de pré-replicação no controle da replicação em *Trypanosoma cruzi*.
- (B) Caracterizar o perfil da replicação da região central do cromossomo I de *Trypanosoma brucei.*

2.2 Objetivos Específicos

(A) i – Avaliar a expressão das proteínas do complexo de pré-replicação,
(TcOrc1/Cdc6 e TcMcm7) no ciclo celular da forma epimastigota de *T. cruzi*.
ii – Determinar a interação de TcOrc1/Cdc6 e TcMcm7 com o DNA durante o ciclo celular de epimastigota.

 iii – Avaliar a expressão de TcOrc1/Cdc6 e TcMcm7 e a interação destas com o DNA nos diferentes estágios do ciclo de vida de *T. cruzi*.

- (B) i Padronizar a técnica de SMARD em Trypanosoma brucei.
 - ii Determinar a velocidade da forquilha de replicação em T. brucei.

iii – Caracterizar o perfil de replicação do fragmento de 347 kb do cromossomo I da forma procíclica de *T. brucei* por meio da técnica de SMARD.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura

3.1.1 Trypanosoma brucei

As formas procíclicas da cepa TREU 927 foram mantidas em meio SDM-79 com 10% de soro fetal bovino a 28 °C. Ao atingir concentração de 10⁷ células/mL, as células foram diluídas para concentração final de 10⁶ células/mL.

3.1.2 Trypanosoma cruzi (cepa Y)

3.1.2.1 Epimastigota

As formas epimastigotas foram mantidas a 28 °C em meio LIT (Camargo, 1964) acrescido de 10 % de soro fetal bovino. As células foram mantidas até atingirem concentração de 10⁷ células/mL quando foram diluídas para 3x10⁶ células/mL.

3.1.2.2 Tripomastigota metacíclico

Para obtenção de formas tripomastigotas metacíclicos foi utilizada cultura de epimastigota envelhecido (cinco dias após repique). Estas células foram estressas por duas horas à 28 °C em meio TAU (2 mM CaCl2; 17 mM KCl; 2 mM MgCl2; 190 mM NaCl; 8 mM tampão fosfato pH 6) na concentração de 5x10⁸ células/mL e em seguida mantidas em garrafa deitada por 72h à 28 °C em meio TAU3aaG (meio TAU acrescido de 2 mM L-aspartato, 50 mM L-glutamato, 10 mM L-prolina e 10 mM de glicose) na concentração de 5x10⁶ células/mL. As células presentes no sobrenadante foram centrifugadas a 1250 x g por 10 minutos e lavadas duas vezes com o mesmo volume de tampão salina fosfato (Na₂HPO₄ anidro 95 mM; NaH₂PO₄.H₂O 5 mM; NaCl 72,7 mM) com 5% de glicose e adicionado à coluna de DEAE celulose (101) previamente equilibrada com 10 volumes deste mesmo tampão. Em seguida a coluna foi lavada com o tampão fosfato salina contendo 5% de glicose. Para avaliar se as células que saem da coluna são tripomastigotas

metacíclicos, após 15 mL de lavagem uma gota foi coletada sobre uma lâmina e analisada ao microscópio. Após o início da saída das formas tripomastigotas metacíclicos a coleta para análise em lâmina foi feita a cada 5 mL até a saída da última célula. As célula foram então centrifugadas a 1250 x g por 15 minutos.

3.1.2.2.1 Resina DEAE celulose

Para preparo de resina DEAE celulose 200 g de resina foram ressuspensos em 500 mL de água milli-Q, homogeneizados, decantados e então o sobrenadante foi descartado. Esta lavagem foi repetida mais duas vezes. Foram então acrescentados 500 mL de tampão salina fosfato 2X (Na₂HPO₄ anidro 95 mM; NaH2PO4.H2O 5 mM; NaCl 72,7 mM) e este foi mantido em agitador magnético por 30 minutos. A solução foi deixada para decantar e o sobrenadante foi retirado, esta lavagem foi repetida mais uma vez. Foi então adicionado mais 500 mL de tampão fosfato salina 2X e o pH foi acertado para 8,0 com H₃PO₄ 5% e então homogeneizado novamente por 30 minutos no agitador magnético. Esta lavagem foi repetida mais 10 vezes, verificando o pH nas últimas lavagens e acertando para pH 8,0 quando necessário. Durante o preparo pode-se parar em qualquer momento, mantendo a resina na geladeira. Após pronta a resina deve ser mantida à -20 °C.

3.1.2.3 Tripomastigota

Células LLC-MK2 (célula de rim de macaco rhesus - *Macaca mulatta*) foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium- invitrogen) com 10% de soro fetal bovino à 37 °C na presença de 5% de CO₂. Em garrafa de 150cm² foi adicionado $2x10^5$ células LLC-MK2 em 40 mL de meio. Após dois dias estas células foram infectadas com 10⁷ células tripomastigotas e então mantidas à 37 °C na presença de 5% de CO₂ por 6 dias, sendo que no quinto dia o meio de cultura foi trocado. O novo meio de cultura foi então coletado, centrifugado à 350 x g por 5 minutos e então incubados por no mínimo 1 hora à 37 °C na presença de 5% de CO₂ para permitir que as formas tripomastigotas migrem para o sobrenadante. Os tripomastigotas foram coletados desprezando cerca de 5mL do fundo do tubo e então centrifugados por 10 minutos a 3220 x g.

3.1.2.4 Amastigota

Para obtenção de amastigotas foi seguido o mesmo protocolo para obtenção de tripomastigotas, porém as células da forma amastigota foram obtidas após 4 dias de infecção das células LLC-MK2 com tripomastigota.

As células LLC-MK2 infectadas foram lavadas uma vez com PBS e desprendidas da garrafa na presença de tampão de injeção (27 mM K₂HPO₄; 8 mM Na₂HPO₄; 26 mM KH₂PO₄;pH7,2) utilizando *scraper*. Estas células foram lisadas mecanicamente em homogeneizador Douncer e centrifugadas a 1000 x g por 5 minutos. As formas amastigotas foram coletadas desprezando os 5 mL do fundo do tubo e então centrifugadas por 10 minutos à 3220 x g.

3.2 Meios de Cultura

3.2.1 LIT

Para 1 litro de meio LIT contendo 10% de soro fetal bovino foram dissolvidos em água Milli-Q os componentes conforme tabela 3.1.

Componente	Quantidade
NaCl	4,0 g
КСІ	0,4 g
Na ₂ PO ₄	8,0 g
Triptose	5,0 g
Infusão de Fígado	5,0 g
Hemina	1 mL solução 10mg/mL em trietanolamina 0,1M

Tabela 3.1- Componentes meio LIT.

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

3.2.2 SDM-79

Para um litro de meio SDM-79 contendo 10% de soro fetal bovino foram dissolvidos em água Milli-Q os componentes constantes na tabela 3.2.

Componente	Quantidade
MEM	7,0 g
Meio 199	2,0 g
MOPS	5,0 g
HEPES	8,0 g
Glicose	1,0 g
NaHCO3	2,0 g
Piruvato de Sódio	0,1 g
L-Alanina	0,2 g
L-Arginina	0,1 g
L-Glutamina	0,3 g
L-Metionina	0,07 g
L-Fenilalanina	0,08 g
L-Prolina	0,6 g
L-Serina	0,06 g
Taurina	0,18 g
L-Treonina	0,35 g
Adenosina	0,1 g
Guanosina	0,01 g
Glucosamina	0,05 g
Mem aa 50X	10 mL
Mem non essencial 100X	6 mL
Penicilina	0,059 g
Streptomicina	0,133g
Ácido Fólico	4 mg
PABA	2 mg
Biotina	0,2 mg
Hemina 2,5mg/mL	3 mL

Tabela 3.2- Componentes meio SDM-79.

O volume foi acertado para 900 mL e o pH ajustado para 7,3 com NaOH. Depois de filtrado foram adicionados 100 mL de soro fetal bovino estéril. Para o ácido fólico, PABA e Biotina foram utilizados 500 µL de solução 8 mg/mL, 200 µL de solução 10 mg/mL e 1 mL de solução 0,2 mg/mL respectivamente. A hemina foi dissolvida em 0,1 M de trietanolamina e autoclavada.

3.3 Ensaio de Sincronização

3.3.1 Trypanosoma brucei

Para ensaios de sincronização (102) 2,5x10⁶ de formas procíclicas foram incubadas com 0,2 mM de hidroxiureia (HU-sigma) por 12 horas. Em seguidas as células foram centrifugadas a 3220 x g por 10 minutos à temperatura ambiente, lavadas uma vez com mesmo volume de PBS1x e após centrifugação foram ressuspensas no mesmo volume inicial de SDM-79 e então mantidas à 28 °C. Foram então coletados pontos a cada hora a partir da retirada da HU até 3 horas da sua retirada. Para análise por citômetro de fluxo 10⁶ células foram separadas e outras 10⁷ células foram separadas para extração de DNA genômico.

3.3.2 Trypanosoma cruzi

Para sincronização das formas epimastigotas foi utilizado hidroxiureia que sincroniza as células na transição das fases G1/S do ciclo celular. Assim foi adicionada hidroxiureia para concentração final de 20 mM em cultura de epimastigota repicada no dia anterior (cerca de 5x10⁶ células/mL). Após 24 horas de incubação com hidroxiuréia, as células foram lavadas com o mesmo volume de PBS1x, centrifugadas por 10 minutos à 3220 x g. Essa lavagem foi repetida mais duas vezes. Em seguida as células foram ressuspensas no mesmo volume de meio LIT (10% SFB) e incubadas à 28 °C. Para obtenção de células na transição das fases G1/S do ciclo celular, foi coletado o ponto 0h (logo após a retirada da hidroxiuréia). Para obter células nas fases S e G2 foram coletados pontos 6h e 14h após a retirada de hidroxiuréia, respectivamente (103).

3.4 Extração DNA genômico

Para a extração de DNA genômico 10^8 células foram lisadas em 150 µL de TELT (50 mM tris-HCl pH 8,0; 62,5 mM de EDTA; 4% TRITON X-100; 2,5 M LiCl₂) e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Ao lisado foi adicionado 150 µL de fenol equilibrado com tris 0,1 M pH8,0 e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente, em seguida foi centrifugado a 20.000 x g por 10 minutos e a fase aquosa superior foi coletada. A esta foi adicionada 150 µL de clorofórmio e após homogeneização foi centrifugado a 20.000 x g por 10 minutos, a fase superior aquosa foi coletada e o DNA presente foi precipitado com o dobro de volume de etanol absoluto gelado. Após centrifugar a 20.000 x g por 10 minutos o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de DNA foi lavado com 500 µL de etanol 70 % gelado e novamente centrifugado por 5 minutos a 37 °C.

3.5 Citômetria de Fluxo

3.5.1 Fixação Trypanosoma brucei

Para fixação 10⁶ células da forma procíclica de *Trypanosoma brucei* foram mantidas a 4 °C por pelo menos 4 h ou até *overnight* em 1 mL de metanol 70%/PBS1x 30% gelado e fresco.

3.5.2 Fixação Trypanosoma cruzi

Para *Trypanosoma cruzi* 10⁷ células da forma epimastigota foram mantidas por pelo menos 4 h ou até *overnight* a -20 °C em etanol 70%/ PBS1x 30% gelado.

3.5.3 Marcação DNA e Leitura

Após fixação as células foram centrifugadas a 500 x g por 3 minutos, lavadas uma vez com PBS 1x e após nova centrifugação foram ressuspensas em PBS 1x contendo 100 mg/mL de RNAse A e 1 0mg/mL de iodeto de propídeo. Estas células

foram incubadas por 30 minutos a 37 °C e em seguida foram feitas as leituras no aparelho FACs BD Callibur conforme os parâmetros na tabela 3.3.

			<u> </u>	
Param	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E00	6,23	Linear
P2	SSC	334	3,12	Linear
P3	FL1	824	5,41	Linear
P4	FL2	550	6,72	Linear
P5	FL3	817	7,04	Linear
P6	FL2-A		4,26	Linear
P7	FL2-W	-	5,57	Linear

Tabela 3.3 – Parâmetros utilizados para análise do ciclo celular deTrypanosomas no aparelho FACs BD Callibur.

3.6 PCR

Na amplificação por PCR foram utilizados 300 ng de DNA genômico de *Trypanosoma* brucei (927) ou de *Trypanosoma cruzi* (cepa CL Brener), 2,5 mM de cloreto de magnésio, tampão contendo sulfato de amônia (tampão 10x de Taq polimerase – Kit Fermentas), 10 pmol de cada *primer*, 0,4 mM de dNTPs e 2U de Taq DNA polimerase (Fermentas).

O programa de amplificação foi feito com temperatura de 94 °C por 3 minutos para separação da dupla fita de DNA, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento dependendo do *primer* utilizado (conforme tabela 3.4) por 30 segundos e 72 °C por 30 segundo para a síntese da seqüência de nucleotídeos. Ao final dos 35 ciclos as amostras foram submetidas a 72 °C por 10 minutos.

Primer	Sequência 5`- 3`	Temperatura de anelamento
123 bp repeat ORI 1 F	CCGAAACCATCATGGACGAG	55 °C
123 bp repeat ORI 1 R	CTCCGGGGCGCATGGTG	55 °C
TcMcm 7 Xba I F	TCTAGAACAGAGGTGCCGTCG CAAGAG	58 °C
TcMcm7 Hind III R	AAGCTTTCACTCCCGTGAAAA CTCAATAATG	58 °C
Tb Ch1 P2 F	ACAGCAGCGAAAGGATAGGA	58 °C
Tb Ch1 P2 R	GCAAATGATGCCAACAACAC	58 °C

Tabela 3.4- Sequência de primers utilizados na amplificação por PCR.

3.7 PCR de Colônia

Colônias de bactérias cultivadas em meio LB-ágar foram coletadas e cada uma foi semeada em 10 µL de LB líquido, do qual 1 µL foi utilizado em uma reação de PCR (conforme já descrito). O programa para amplificação utilizado foi mesmo já descrito acima acrescido de uma etapa inicial de temperatura de 95 °C por 5 minutos com a finalidade de lisar as bactérias.

3.8 Construção

Os fragmentos amplificados por PCR foram separados em gel de agarose 1% em TAE 1X (40 mM Tris; 20 mM ácido acético; 1 mM EDTA; pH8,0) a 120 V. O fragmento no tamanho esperado, com base no padrão de pares de bases, foi cortado e eluído do gel utilizando *Silica Bead DNA Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific) conforme instruções do fabricante.

3.8.1 pJET-123bp repeat ORI1

A amplificação da repetição de 123 bp gerou fragmentos de diversos tamanhos que possuem uma ou mais cópias desta repetição de 123 bp (5` AAC CGA AAC CAT CAT GGA CGA GGC ACC ATG CGC CCC GGA GGA CTT CCT AGC GGA GGA ATC CCA GCA ACA CAC TGC GAG GAG TGA AGC TGA CAT TGA TGA AGA GCA GCA GCC GCA GGA GCA GCA 3`). O fragmento na altura correspondente a duas cópias da repetição foi recuperado do gel de agarose e clonado no vetor CloneJET (Thermo Scientific) conforme instruções do fabricantes. Em seguida foi transformado em *E. coli* DH5- α e plaqueado em LB-ágar contendo 100µg/mL de ampicilina. A seleção de colônias que continham o inserto foi feito por meio de PCR de colônia utilizando os *primers* do vetor CloneJET (Tabela 3.5)

Tabela 3.5- Sequência primers CloneJET.

Primer	Sequência 5`- 3`	Temperatura de anelamento
pJET 1.2 forward sequencing primer	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	55 °C
pJET 1.2 reverse sequencing primer	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	55 °C

3.8.2 pMal-TcMcm7

O fragmento de PCR purificado foi clonado no vetor TOPO®-TA cloning (Life Technologies), transformado em bactérias competentes *E. coli* DH5-α e estas foram plaqueadas em LB-ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina. Diversas colônias foram então crescidas em 2 mL de meio LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina e submetidas à lise alcalina. Os plasmídeos recuperados foram digeridos com a enzima de restrição EcoR I a fim de identificar colônias contendo plasmídeo com o inserto. De uma das colônias positivas foi feito novo cultivo em 5 mL de meio LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina e o DNA plasmidial foi purificado utilizando QIAprep Spin miniprep Kit (Qiagen) conforme instruções do fabricante . O plasmídeo recuperado foi então digerido com as enzimas de restrição Xba I e Hind III e os fragmentos foram separados em gel de agarose 1%. O fragmento correspondente à sequência de TcMcm7 foi eluído do gel e então ligado no vetor pMALc2x previamente linearizado com as enzimas Xba I e Hind III e transformados em E. coli DH5- α . Após seleção de colônia que contém o inserto, como já descrito acima, através de lise alcalina seguida de digestão dos plasmídeos com as enzimas de restrição Xba I e Hind III, o vetor pMALc2x-TcMcm7 obtido foi sequenciado e transformado em *E. coli* Rosetta (DE3) (Novagen) e plaqueado em LB-ágar na presença de 100 µg/mL de ampicilina.

3.9 Bactérias Competentes

3.9.1 Preparo de Bactérias Termocompetentes (Escherichia coli)

Uma colônia de *E. coli* DH5- α ou Rosetta (DE3) recém plaqueada em LB-ágar sem antibiótico ou na presença de 30 µg/mL de cloranfenicol, respectivamente, foi inoculada em 3 mL de LB líquido (com ou sem cloranfenicol) e incubada por 16 horas a 37 °C sob agitação de 180 rpm. Este pré-inóculo foi adicionado em 250 mL de LB (na presença ou ausência de cloranfenicol) e incubado sob as mesmas condições até atingir DO₅₅₀ entre 0,35 e 0,6. Estas bactérias foram incubadas no gelo de 10 a 60 minutos, centrifugadas a 1.800 x g por 15 minutos sob refrigeração e o *pellet* foi ressuspenso em 1/3 do volume original em FB (KCI; 50 mM CaCl2.2H2O; 10% glicerol (m/V); 10mM acetato de potássio; pH6,2) filtrado e gelado. Após incubação de 10 a 60 minutos no gelo as bactérias foram novamente centrifugadas e o *pellet* foi ressuspenso em 1/12,5 do volume original em FB, em seguida foram feitas alíquotas de 200 µL e estas estocadas a -20 °C.

3.9.2 Transformação de Bactérias Competentes por Choque Térmico

Em tubo de transformação foi adicionado 200 μL de bactéria competente (*E. coli* DH5-α ou Rosetta) juntamente com o DNA a ser transformado, 100 ng no caso de vetor fechado (com ou sem inserto) ou o volume total de uma reação de ligação vetor-inserto. O tubo foi incubado no gelo por 30 minutos e em seguida incubado por 1 minuto à 42 °C e colocado imediatamente no gelo por 5 minutos. Ao tubo foi adicionado 1 mL de LB líquido que foi incubado à 37 °C sob agitação de 180 rpm por 1 hora. As bactérias cultivadas neste meio foram finalmente plaqueadas em LB-ágar contendo o antibiótico de seleção, incubadas em estufa a 37 °C por cerca de 16 horas. No caso de vetor fechado (com ou sem inserto) foram feitas duas placas de LB-ágar onde foi cultivado 200 μL e 800 μL em cada placa, já para as ligações vetor-inserto 1 mL foi cultivado em apenas uma placa de LB-ágar.

3.10 Lise Alcalina

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

3.11 TcMcm7 recombinante

3.11.1 Expressão Pequena Escala

Após a construção do vetor pMALc2x-TcMcm7, que irá gerar proteína recombinante de TcMcm7 (rTcMcm7-MBP) conjugada à MBP-Maltose Binding Protein, e sua transformação em bactérias E. coli Rosetta (DE3), foram feitos préinóculos de 4 colônias que foram cultivadas em 2 mL de LB líquido, contendo 100 µg/mL de ampicilina e 40 µg/mL de cloranfenicol, e incubadas a 37 °C sob agitação de 180 rpm por 16 horas. De cada pré-inóculo foram cultivados dois tubos distintos, um para induzir com IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) e outro não induzido. Assim 200 µL de cada pré-inóculo foi adicionado em dois tubos distintos contendo 1,8 mL de LB líquido com ampicilina e cloranfenicol e foram incubados por 3 h a 37 °C sob agitação de 180 rpm. Em seguida foi adicionado 1 mM de IPTG apenas a um tubo de cada colônia e todos os tubos foram incubados por mais 3 horas nestas mesmas condições. Ao final 150 µL de cada tubo foi coletado e centrifugado a 3000 x g por 5 minutos e o *pellet* de bactéria foi ressuspenso em 30µL de sample buffer 2x (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 0,02% bromofenol azul; 20% glycerol; 5% βmercaptoetanol), fervido por 5 minutos a 95 °C e centrifugado a 20000 x g por 1 minuto. 15 µL do sobrenadante foi aplicado em gel de acrilamida 7,5% intercalando

extrato de bactéria não induzido e induzido de cada colônia. Após corrida o gel foi corado por 15 minutos com *Coomassie blue* (0,1% coomassie R250; 10% ácido acético glacial; 40% metanol) e em seguida descorado com solução descorante (20% metanol; 10% ácido acético glacial) até atingir coloração desejada. O gel foi analisado para determinar quais colônias expressaram a proteína recombinante.

3.11.2 Expressão Larga Escala

A partir de uma colônia expressando rTcMcm7-MBP foi feito um pré-inóculo em 50 mL de meio LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina e 40 µg/mL de cloranfenicol, que foi mantido sob agitação de 180 rpm por 16 horas a 37 °C. O cultivo foi então ampliado para 500 mL de LB líquido, contendo ampicilina e clorafenicol, e incubado a 37 °C sob agitação de 180 rpm até atingir DO₅₅₀ entre 0,6 e 0,8. Neste momento foram separados 2 mL em um tubo e ao restante foi adicionado IPTG para concentração final de 1 mM e ambos foram então incubados por mais 3 horas nas mesmas condições anteriores. Após confirmação da expressão de rTcMcm7-MBP, por meio de extrato e gel de acrilamida como descrito no item anterior, as bactérias foram submetidas à lise. Os 2 mL separados antes da adição de IPTG foram utilizados para extrato de bactérias não induzidas e uma alíquota das bactérias induzidas com IPTG foi usado no preparo do extrato de bactéria induzidas à expressão de TcMcm7-MBP.

3.11.3 Lise

As bactéria induzidas com IPTG foram centrifugadas por 10 minutos a 7000 x g e o *pellet* foi ressuspenso em 30 mL de tampão da coluna de amilose (20mM tris-HCl pH 7,4; 200mM NaCl e 1mM EDTA) contendo inibidores de protease (*EDTA-free Cqmplete protease inhibitor cocktail* da Roche). Estas bactérias foram lisadas sob pressão de 1500 psi (*pounds per square inch*) em *FRENCH Pressure Cell Press* por duas vezes sempre mantidas em gelo. O lisado foi centrifugado a 18000 x g por 30 minutos e o sobrenadante contendo a proteína solúvel foi purificada em coluna de amilose.

3.11.4 Purificação rTcMcm7-MBP

Em uma coluna de vidro foi adicionada 1 mL de resina de amilose (*New England Biolabs*) que foi equilibrada com 5 volumes de tampão coluna de amilose (20 mM tris-HCl pH 7,4; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA). Em seguida foi adicionada à coluna 10 mL do sobrenadante do lisado de bactérias contendo rTcMcm7-MBP, que passou pela resina apenas sob força da gravidade e o *flow-through* que saiu da resina foi novamente introduzido na coluna. A resina foi lavada com 20 volumes de tampão coluna de amilose e a proteína recombinante foi eluída em 4 alíquotas de 1 mL de tampão coluna de amilose contendo 30 mM de maltose.

3.11.5 Anti-TcMcm7

A produção de anticorpo policional foi realizada em colaboração com o Dr. Osvaldo Augusto Sant'Anna do laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan.

A proteína recombinante TcMcm7-MBP foi dialisada contra PBS1x para a realização das imunizações. Para a imunização foram utilizados os camundongos geneticamente selecionados para alta resposta (linhagem HIII) (104), de 2 a 3 meses de idade. A imunização foi feita com 2 µg de rTcMcm7-MBP em *mesoporous sílica SBA-15* (105) , via subcutânea em volume final de 200 µL. Uma segunda dose foi realizada 90 dias depois do mesmo modo que a primeira dose. Amostras de sangue foram coletadas em diferentes períodos após as imunizações por meio do plexo venoso retro-orbital e o soro foi armazenado a -20 °C.

3.12 Real Time PCR

Para ensaio de *Real Time* PCR oligonucleotídeos foram desenhados utilizando o programa *primer BLAST* a fim de amplificar fragmentos de 100 bp conforme tabela 3.6. Para cada reação foi utilizado 10 µL do mix SYBR Green (Applied Biosystem), 50 nM (concentração final) de cada *primer (forward* e *reverse*) e 50 ng de DNA genômico extraído utilizando DNAzol (Invitrogen) para uma reação de volume final de 20 µL. A reação foi realizada no termociclador *Step One Plus* (Applied Biosystem) conforme programa abaixo:

Stage 1(1X) 95 °C 10 minutos

Stage 2 (40X)	95 °C 15 segundos
	60 °C 1 minuto
Melt Curve (1X)	95 °C 15 segundos
	60 °C 1 minuto
95 °C	15 segundos

Os dados obtidos pelo pograma *Step One Plus* foram exportados para planilha Excel e a eficiência dos *primers* e C_t (*threshold cycle*) foram obtidos utilizando o programa LinRegPCR (2012.x). A análise da quantificação relativa da replicação de determinada região do genoma em meio e final de fase S foi feita utilizando o método Pfaffl (106) conforme equação abaixo:

 $\frac{Eamostra^{\Delta Ct \ (controle-teste)}}{Eref^{\Delta Ct \ (controle-referência)}}$

Sendo E a eficiência do *primer* e ΔC_t a diferença entre o C_t da amostra controle e da amostra teste (DNA genômico de células em meio e final de fase S). Para tanto foi utilizado como gene de referência uma sequência específica de DNA do cinetoplasto e como amostra controle o DNA de células sincronizadas em G2.

Tabela 3.6- Sequência de primers utilizados na amplificação por Real Time PCR.

Primer	Sequência 5`- 3`
-50kb ori1 F	GAACAAACGCATTGGAGGTG
-50kb ori1 R	GCACTTGTTGTCTCCCAAAC
5' ori1 F	GTTCCATGACTGAGGAGCAG
5' ori1 R	GTCTCAACTGGAGGTCGAAG
3' ori1 F	GTATGGATTTCGCCACGCTC
3' ori1 R	CGTTTTCAACAGTGCCATCC
+50kb ori1 F	CTACCGACCGAAAGGAACTG
+50kb ori1 R	CGCTTCAATCCGAAGCAAAG
Tb cr1 RT 550kb F	TGGATGTTCCACCGCTTTCA
Tb cr1 RT 550kb R	TGTTCTTCAGATCCTGCGGT
Meio ori1 cent F	GGAATTGGCCCACAAAATGG
Meio ori1 cent R	CAACATCACCGACTACCTGG
rDNA 28S cent F	CAACCGTGATTCTCTCAGTCAG
rDNA 28S cent R	CCACAAAAATGGTGCCACAG
Tb apocytochrome kDNA F	GGAGATTCTTGGGGAGAGGC
Tb apocytochrome kDNA R	GCAATTCCCAATTCCATTTCCC

3.13 Extrato Total

Para obtenção de extrato total celular, 10^8 células foram ressuspensas em 100 μ L de *Sample Buffer* 2X e sonicado duas vezes de 30 segundo com intervalo de 1 minuto no gelo. Para aplicação em gel de acrilamida o extrato foi incubado a 95 °C por 5 minutos e centrifugado a 20000 x g por 1 minuto. Apenas o sobrenadante foi aplicado ao gel na proporção de 10^7 células por poço.

3.14 Extrato Diferencial

Para extração diferencial de proteínas solúveis foi utilizado o tampão de extração (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 300 mM sacarose; 3 mM MgCl₂; 50 mM NaF; 1 mM Na₃VO₄; 0,5 mM PMSF; 0,1% Triton X-100 e coquetel de inibidores de protease – Roche) (86) e para obtenção de proteínas ligadas ao DNA foi realizado tratamento com DNAse I (Fermentas) do pellet contendo proteínas insolúveis no tampão de extração. Cerca de 10⁸ células foram ressuspensas em 100 µL de tampão de extração e incubadas no gelo por 10 minutos, em seguida foram centrifugadas a 10000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido como fração I de proteínas solúveis. Ao pellet foram novamente adicionados 100 µL de tampão de extração, incubado por mais 10 minutos no gelo e centrifugado novamente. O sobrenadante foi recolhido como fração II de proteínas solúveis. O pellet foi então ressuspenso em 100µL de tampão 1X para enzima DNAase I contendo 50 unidades desta (Fermentas) e incubado por 30 minutos a 37 °C. Após centrifugação o sobrenadante foi recolhido como fração I de proteínas ligadas ao DNA e o pellet foi novamente ressuspenso em 100µL de tampão 1X para enzima DNAse I contendo 50 unidades da enzima. Finalmente foi realizada nova centrifugação e o sobrenadante foi coletado como fração II de proteínas ligadas ao DNA. Aos extratos foi acrescentado sample buffer 5x (para concentração final 1x) que foram fervidos a 95 °C por 5 minutos antes de sua aplicação no gel de acrilamida.
3.15 SDS PAGE

3.15.1 Preparação do Gel de acrilamida/bisacrilamida

O gel de acrilamida é composto por duas fases, o *stacking gel* (tabela 3.7) no topo que tem a função de compactar as proteínas permitindo assim sua entrada concomitante na segunda fase do gel, o *separating gel* (tabela 2.8), que é a fase inferior do gel onde de fato as proteínas são separadas conforme seu peso molecular. A porcentagem do *separating gel pode* variar conforme o tamanho da proteína a ser analisada. Na tabela 3.8 estão os componentes para montar diferentes géis de diferentes porcentagens.

Tabela 3.7- Componentes para 5mL de stacking gel.

Componente	Volume
Acrilamida/Bisacrilamida (30% / 0,8% m/V)	670 μL
O,5M Tris-HCI (pH 6,8)	1,25 mL
SDS 20% (m/V)	25 μL
Persulfato de Amônio 10% (m/V)	50 μL
TEMED	5 µL
H ₂ O	3 mL

Tabela 3.8- Componentes para 10mL de separating gel.

Porcentagem	7,5%	10%	12,5%	15%
Acrilamida/Bisacrilamida	2,5 mL	3,4 mL	4,2 mL	5 mL
(30% / 0,8% m/V)				
1,5M Tris (pH 8,8)	2,6 mL	2,6 mL	2,6 mL	2,6 mL
SDS 20% (m/V)	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Persulfato de Amônio	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
10% (m/V)				
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
H ₂ O	4,74 mL	3,84 mL	3,04 mL	2,24 mL

Os catalisadores da polimerização do gel, persulfato de amônio e TEMED, devem ser adicionados apenas no momento de aplicar a solução de gel nas placas de vidro. O volume necessário de gel varia conforme a espessura da placa utilizada, conforme indicado na tabela 3.9.

Tabela 3.9-	Volumes	necessários	de stac	king e	separating	<i>gel</i> par	a as	diferentes
	espessu	ras de géis.						

Espessura do Gel	Volume de Stacking Gel	Volume de Separating Gel
0,75 mm	2 mL	4 mL
1,0 mm	3 mL	6 mL
1,5 mm	4 mL	8 mL

3.15.2 Corrida e Transferência Gel de Acrilamida

A separação das proteínas nos géis de acrilamida foi feita em tampão de corrida (25 mM de tris-base; 19,2 mM de glicina; 0,1% de SDS - Sodium dodecyl sulfate) sob voltagem constante de 200 V por cerca de 50 minutos ou até que o azul de bromofenol (presente nas amostras de extrato proteico) atingisse o final do gel.

Para ensaios de *immunoblotting* as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond C) em tampão de transferência (47,9 mM de tris-base; 38,6 mM de glicina; 0,037% de SDS; 20% de metanol), para tanto foi montado um sanduiche composto, respectivamente, por papel para *blotting* (Whatman 3MM Chr), gel de acrilamida, membrana de nitrocelulose e papel para *blotting* que foram umedecidos previamente à montagem do sanduiche em tampão de transferência. A transferência das proteínas do gel para a membrana foi feita do polo negativo para o positivo em sistema semi-seco (*Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* /Bio-Rad) a 20 V, 350 mA e 50 W por 30 minutos ou em sistema úmido (*Wet/Tank Blotting Systems*/Bio-rad) à 350 mA constante por 1 horas. Neste último caso ao sanduíche é acrescentado uma esponja para transferência de cada lado.

As membranas foram então coradas em Ponceau (0,1% Ponceau e 1% ácido acético) por 2 minutos e descoradas em água destilada.

3.16 Immunoblotting

As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com PBS1X (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄;pH 7,4) /5% Molico por no mínimo 30 minutos sob agitação à temperatura ambiente. Em seguidas as membranas foram incubadas por no mínimo 1 hora com os anticorpos primários diluídos em PBS1X/5% molico sob agitação à temperatura ambiente conforme tabela 3.10. Foram

então realizadas 3 lavagens consecutivas de 10 minutos em PBS1X/ 0,1% Tween-20 a temperatura ambiente sob agitação. As membranas foram então incubadas por 1 hora com anticorpos secundários anti-imunoglobulina de coelho ou antiimunoglobulina de camundongo conjugadas a peroxidase (KPL) diluídos 1:2000 em PBS1X/5% Molico. As lavagens foram então repetidas e a membrana foi incubada com substrato quimioluminescente para a peroxidase (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate/Miilipore) conforme instruções do fabricante e em seguida diferentes tempos de exposição foram feitas em filme radiográfico (Kodak) que foram revelados e fixados em soluções reveladora e fixadora (ambos Kodak), respectivamente.

Anticorpo Anti:	Diluição	Organismo de Origem	Fonte
TcOrc1/Cdc6	1:1000	Camundongo	(86)
TcPCNA	1:200	Camundongo	(90)
TcMcm7	1:500	Camundongo	Produzido no presente trabalho
TcGAPDH	1:1000	Camundongo	(107)
Hsp70	1:2000	Camundongo	(108)
elF5A	1:20000	Coelho	(109)
Histona H3	1:2000	Coelho	Abcam
Histona H4	1:1000	Coelho	(110)

Tabela 3.10- Anticorpos usados em ensaios de immunoblotting.

3.17 FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)

3.17.1 Marcação da Sonda

Sondas utilizadas em ensaios de FISH foram marcadas por PCR com digoxigenina (Digoxigenin-11-dUTP/Roche). Desta forma 100ng de DNA de PCR purificado utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) foram usados na reação contendo 5U da enzima *Taq* DNA polimerase (invitrogen) e seu respectivo tampão, 1,5 mM de MgCl₂, 10 pMol de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 200 µM de mix de dNTP (sem dTTP), 130 µM de dTTP e 70 µM de digoxigenina-11-dUTP (Roche). A reação foi realizada no termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) onde foi submetida à 94°C por 5 minutos seguida por 30 ciclo de 94°C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos. Ao final a reação foi mantida por 10 minutos a 72 °C.

3.17.2 Lâmina

Para realização de ensaio de FISH as lâminas foram incubadas com SDS 1% por pelo menos duas horas em acetona 100% por 1 minuto e após sua secagem o selo *Frame-seal* de volume de 25 μ L (Bio Rad) foi colado à lâmina. Cerca de 10⁶ células da forma procíclica de *T. brucei* cepa TREU 927 foram lavadas uma vez com PBS e diluídas em 100 μ L de PBS1x que foi colocado sobre a lâmina cotendo o selo para hibridização *in situ Frame Seal* (Bio-Rad). Após adesão das células à lâmina, essas foram fixadas com paraformaldeído 2% por 25 minutos, em seguida lavadas com PBS1x e permeabilizadas com PBS1x/Triton X-100 0,1% por 5 minutos. A lâmina foi lavada com PBS e pós-fixada com PBS/formaldeído 2% por 10 minutos e as células foram desidratadas com sucessivas incubações de 5 minutos em etanol 70%, 90% e 100% e em seguidas deixadas para secar.

Foram utilizadas duas diferentes sondas nos ensaios de FISH, uma para a identificação de ORI1 que foi amplificada do vetor pJET 123 repeat ORI1 por PCR e marcada por com digoxigenina utilizando os *primers* do vetor pJET (Tabela 3.5). A outra sonda para identificação do centrômero foi sintetizada (Life Technologies) acoplada à biotina, utilizando a sequência repetitiva do centrômero do cromossomo 1 de *T. brucei* (5' ATG CGC AAT AAT ACG CAA TAA TAC GCA ATA ATG CGC AAT AAT GCA CAC ATA TGC ACA ATT ATG CAA TA 3')(111).

Para hibridização foi usada a solução de hibridização contendo 2XSSPE (1XSSPE contém 0,18 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄ e 1 mM EDTA [pH 7,7]), 50% formamida e 10% de dextran sulfato. Assim 100ng de sonda marcada por PCR ou 200 ng de sonda sintetizada foram adicionadas em 25 μ L de solução de hibridização. Este foi aquecido por 8 minutos a 85 °C e em seguida colocado sobre a lâmina dentro do *frame-seal* e então este foi selado. A lâmina foi fervida por 5 minutos a 95 °C e incubada a 37 °C por 16 horas.

As lâminas foram lavadas em 2xSSC (SSC20X: 3 M NaCl e 300 mM Citrato de sódio pH7,0)/50% formamida por 30 minutos a 37 °C. Em seguida foram feitas duas lavagens a 50 °C com 2xSSC e 0,2xSSC por 10 e 50 minutos, respectivamente, e ainda foi feita outra lavagem em 4xSSC por 10 minutos a temperatura ambiente.

As lâminas foram bloqueadas com PBS1x/BSA1% por 30 minutos que foi seguida da detecção das diferentes sondas. A sonda marcada com digoxigenina foi detectada com anti-digoxigenina (Roche) diluído 1:150 em PBS1x/BSA1% e

incubado por 45 minutos a temperatura ambiente, após lavagem com PBS1x foi feita nova incubação de 45 minutos com anti-sheep marcado com Alexa 555 (Molecular Probes). Já a detecção da sonda sintetizada biotinilada foi feita com streptavidina-FITC (eBioscience) diluída 1:150 em PBS1x/BSA1%, depois da lavagem uma segunda incubação de 45 minutos foi feita com anti-streptavidina biotinilada (Molecular Probes) e após nova lavagem com PBS1x foi feita uma terceira incubação de 45 minutos com streptavidina-FITC. O núcleo foi marcado com DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole/Molecular Probes) diluído 1:1000 (solução estoque de 5mg/mL) em PBS1x. Finalmente a lâmina foi montada com Vecta-Shield (Vector) e as imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência Olympus BX51 com objetiva planar apocromática de aumento de 100x com imersão em óleo, acoplada à câmera Olympus XM10 utilizando software CelIF. As imagens adquiridas foram processadas em Adobe Photoshop.

3.18 Imunofluorescência

Para realização de lâminas de imunofluorescência 10⁷ parasitas foram centrifugados (800x g por 3 minutos), lavados com PBS1x, centrifugados e o *pellet* foi ressuspenso em 1mL de PBS1x. 50µL destes parasitas foram colocados em cada poço de lâmina contendo 8 poços (Tekdon Inc.) e foram deixados em repouso por 5 minutos para que os parasitas aderissem ao vidro da lâmina. Estes foram então fixados por 20 minutos com paraformaldeído 2% e então permeabilizados com 0,1% de TRITON X-100 por 5 minutos. As células foram bloqueadas com PBS/BSA1% por 30 minutos e em seguida incubadas por 1 hora com anticorpo primário anti-TcOrc1/Cdc6 diluído 1:500 em PBS/BSA1%. Após 5 lavagens sucessivas com PBS1x, as células foram incubadas por 1h com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à Alexa 555 diluído 1:300 em PBS/BSA1% acrescido de DAPI 1:1000(estoque 5 mg/mL). Após 5 lavagens sucessivas com PBS1x, a lâmina foi montada com Vecta Shield.

As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência Olympus BX51 com objetiva planar apocromática de aumento de 100x com imersão em óleo, acoplada à câmera Olympus XM10 utilizando software Cell F. As imagens adquiridas foram processadas em Adobe Photoshop.

3.19 Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP)

3.19.1 Obtenção da Cromatina

Para ensaio de imunoprecipitação de cromatina foram utilizadas 10⁹ células da forma procíclica de Trypanosoma brucei de cultura em fase de crescimento lagarítmico. Estas células foram centrifugadas a 3000 x g por 10 minutos, lavadas uma vez com o mesmo volume de PBS 1x e ressuspensas no mesmo volume incial de PBS1x. As células foram então fixadas adicionando formaldeído para concentração final de 1% e incubando por 30 minutos a temperatura ambiente sob agitação. A reação de fixação foi interrompida pela adição de 125 mM de glicina (concentração final) por 5 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida as células fixadas foram centrifugadas a 3000 x g por 15 minutos a 10 °C, lavadas uma vez em PBS1x/125 mM glicina gelado seguida de outras duas lavagens com apenas PBS1x gelado. Após nova centrifugação de 15 minutos a 3000 x g a 10 °C, o pellet de células foi ressuspenso em 2 mL de tampão de lise para ChIP (50 mM HEPES pH7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% de deoxicolato de sódio; 1% NP-40; 1 mM PMSF e coquetel de inibidores de protease-Roche) e sonicado por 8 vezes de 10 segundos cada, com intervalos de 1 minuto em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a 20000 x g por 1 hora a 4°C e o sobrenadante foi coletado. Para controle de input 10% deste sobrenadante foi coletado e o DNA extraído com fenol/clorofórmio, os demais 90% foram utilizados para a imunoprecipitação.

3.19.2 Imunoprecipitação da Cromatina

A imunoprecipitação foi feita adicionando o anticorpo anti-TcOrc1/Cdc6 na diluição de 1:1200 e incubando por 2 horas a 4 °C sob agitação. Em seguida a amostra foi centrifugada a 20000 x g por 15 minutos a 4 °C e colocada em novo tubo contendo 40 µL de resina de proteína G sepharose por 2 horas a 4°C com agitação (a proteína G sepharose foi previamente tratada com BSA na concentração final de 5 mg/mL por 5 minutos no gelo e depois centrifugada a 3800 x g por 1 minuto). Após esse tempo a amostra foi lavada por 2 vezes com 1 mL de tampão de lavagem de ChIP (10 mM de Tris-HCI pH 8; 250 mM de LiCl; 0,5% de dioxicolato sódico; 1 mM de EDTA e 0,5% de NP-40) e por 2 vezes com TE (10 mM de Tris-HCI pH 8 e 1 mM

de EDTA). Para reverter a ligação proteína-DNA a cromatina imunoprecipitada foi eluida adicionando 250 µL de tampão de eluição (50 mM de Tris-HCI pH 8; 10 mM de EDTA e 1% de SDS) e incubada a 65°C por 16 horas sob agitação de 400 rpm. Após centrifugação o sobrenadante foi coletado e o DNA obtido foi então purificado com fenol/clorofórmio.

3.19.3 Purificação do DNA com fenol/clorofórmio

À amostra contendo DNA foi adicionado TE até completar um volume de 300 μ L. A este volume foi então acrescentado 300 μ L de fenol e agitado usando *vortex*. A amostra obtida foi centrifugada a 20000 x g por 15 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante aquoso foi recolhido em um tubo novo. A este sobrenadante foi adicionado 300 μ L de clorofórmio e após homogeneização foi novamente centrifugado. A fase aquosa superior foi coletada e foi adicionado 10% do volume obtido de acetato de sódio 3 M pH5,2 e 3,5 volumes de etanol absoluto gelado. O material foi incubado por 1 hora em gelo seco. Após esse tempo a amostra foi centrifugada a 20000 x g por 10 minutos e o *pellet* foi lavado com etanol 70% e novamente centrifugado. Finalmente a amostra foi secada a 65 °C por 10 minutos e ressupensa em 20 μ L de TE.

3.19.4 Hibridização com Sondas de DNA

Em uma membrana de nylon (Hybond N+) foi gotejado o DNA de controle de *input* e o DNA obtido da imunoprecipitação previamente desnaturado por 5 minutos a 95 °C seguida de incubação de 3 minutos no gelo. Em seguida foi feito o *crosslink* do DNA com a membrana expondo esta por 15 minutos à luz UV do transiluminador de captura de imagens de géis de agarose. Para detecção de sequências específicas foram utilizadas sondas de DNA marcadas com fosfatase alcalina. A sonda para 123 bp repeat-ORI1 foi obtida através de amplificação por PCR do vetor pJET-123 bp repeat ORI1 utilizando os *primers* do próprio vetor (Tabela 3.5) seguida de sua purificação, já a sonda para controle negativo foi sintetizada (5` CTT GGC TCG CGT GAG TGG AAG G 3`- Life Technologies).

A marcação das sondas, bloqueio, hibridização e lavagem da membrana foram feitas utilizando o kit Armesham AlkPhos Direct Labelling (GE Life Science) e a

detecção foi feita utilizando substrato quimioluminescente para fosfatase alcalina *CDP-Star Detection Reagent (GE Life Science*), conforme instruções do fabricante. Em seguida filmes radiográficos (Kodak) foram expostos às membranas por cerca de 16 horas, então revelados e fixados nas soluções reveladoras e fixadoras (Kodak), respectivamente.

3.20 SMARD

3.20.1 Incorporação de Análogos de Timidina

Cultura em crescimento exponencial da forma procíclica de *Trypanosoma brucei* cepa TREU 927, cerca de 5x10⁶ parasitas/mL, foram incubados por 40 minutos com 100 µM de 5-lodo 2- deoxiuridina (IdU-Sigma Aldrich) em meio SDM 79 a 28 °C. Em seguida as células foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 x g e incubadas em SDM-79 com 100 µM de 5-Cloro 2-deoxiuridina (CldU-Sigma Aldrich) por 40 minutos a 28 °C. Em geral foram utilizados 100 mL de cultura, ou seja, 5x10⁸ células totais. É importante ressaltar que em todos os passos a seguir o DNA utilizado foi protegido da luz por meio de envolvimento dos tubos em papel alumínio ou mesmo desligando as luzes do laboratório nos momentos em que não foi possível fazer a proteção com o papel alumínio.

3.20.2 Preparação de plugs para Pulsed Field Electrophoresis Gel (protegido da luz)

As células foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 x g lavadas uma vez com o mesmo volume de PBS 1x gelado, centrifugadas novamente e ressuspensas em 450 μ L de PBS 1x. Estas células foram equilibradas a 42 °C por 5 minutos, e em seguida foi adicionado 450 μ L de 1% Low Melting Agarose (InCert® Agarose-Lonza) também previamente equilibrada a 42 °C por 5 minutos. Após homogeinização, 90 μ L contendo 5x10⁷ parasitas, foram colocados em fôrma de *plugs* para PFGE e foram deixadas para solidificar sobre gelo por 20 min.

Os plugs foram então incubados por 24h a 50 °C em 50 mL de tampão de lise (0,5M EDTA e 1% sarcosina [*N-lauroyIsarcosine sodium salt*/Sigma Aldrich]) contendo 200 µg de proteinase K. Após 24 h o tampão de lise foi trocado, nova proteínase K foi adicionada e os plugs foram incubados por mais 24 h à 50 °C. Este

processo foi repetido mais uma vez. Em seguida os plugs foram lavados em 50 mL de TE pH 8 (10mM Tris, 1 mM EDTA) por 1h sob agitação a temperatura ambiente. O tampão TE pH 8 foi trocado e os plugs foram então incubados por 1h a 50 °C. Nova troca do TE pH8 foi feita e PMSF foi adicionado à concentração final de 200 μM. Os plugs foram incubados por 30 min a 50 °C. Esta lavagem foi repetida mais uma vez. O tampão TE pH 8 foi novamente trocado e os plugs foram incubados a temperatura ambiente por 1h. Esta lavagem foi repetida mais uma vez e em seguida o tampão foi trocado novamente e os plugs foram incubados *overnight* a 4 °C. Neste ponto os plugs podem ser estocados em tampão de estocagem (50 mM EDTA e 10mM Tris-HCl pH 8) a temperatura de 4 °C por diversos meses, ou então podem ser digeridos com enzima de restrição.

3.20.3 Digestão do DNA em plugs de agarose (protegido da luz)

No caso de plugs mantidos em tampão de armazenamento, estes foram lavados de 3 a 5 vezes em 50 mL de TE pH8 por 1h à 4 °C (sendo a última lavagem *overnight* a 4°C) antes do passo seguinte. Os plugs foram então enxaguados em água Milli-Q, em seguida lavados no tampão de pré-digestão (10 mM MgCl₂ e 10 mM Tris-HCl pH8) seguida de mais duas lavagens neste mesmo tampão a temperatura ambiente, sob agitação por 1h cada lavagem.

Cada *plug* foi transferido para tubo de 1,5 mL e equilibrado por 30 minutos a 150 rpm no tampão específico da enzima a ser usada na digestão. Esta etapa foi repetida por mais duas vezes, fazendo a troca do tampão a cada nova incubação. O tampão foi retirado após a última lavagem, quando adicionou-se 150 µL do tampão de digestão com 30 unidades da enzima de restrição. A amostra foi incubada no gelo por 30 minutos para permitir a difusão da enzima na agarose e incubada *overnight* a temperatura ideal de atividade da enzima de restrição. Após a digestão, o *plug* foi lavado com 1,5 mL de TE pH 8 a temperatura ambiente por 1h a 150 rpm ou por pelo menos 2 horas a 4 °C.

3.20.4 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)- (protegido da luz)

A montagem de gel de agarose 0,8% para a corrida foi feita com *low melting* agarose (SeaKem® GTGTM agarose/Lonza) em TAE 0,5x com um único poço grande (pente sem separação para diferentes poços), de forma a permitir a colocação de 3 a 4 *plugs* de agarose justapostos. Foram utilizados os marcadores *S. cerevisiae* chromosomal DNA (Bio-Rad; Figura 3.1A) e *Lambda Ladder PFG Marker* (New England BioLabs®_{Inc}.; Figura 3.1B) . A corrida foi feita no CHEF Mapper XA (Bio-Rad) e o programa utilizado foi: *two state* com 120° *included angle*, 6V/cm por 30 horas com pulso inicial de 18 segundos e pulso final de 33 segundos em rampa linear em TAE 0,5x.

Figura 3.1- Marcadores padrão para *Pulsed Field Gel.* Em (A) *S. cerevisiae* chromosomal DNA (Bio-Rad) e (B) *Lambda Ladder PFG Marker* (New England BioLabs®Inc.).

A



Após corrida, uma fatia central entre os três plugs de agarose foi cortada (figura 3.2), retirada e armazenada em tampão de estocagem (50 mM EDTA e 10 mM tris HCI pH 8). O corte foi feito de forma a permanecer amostra de DNA nas bordas da região retirada no gel que restou. Este foi refeito preenchendo a região retirada com agarose 1% (não necessita ser *low melting*) e após solidificação o gel foi corado com brometo de etídeo por 2 horas usando 0,5 µg/mL de brometo de etídeo ou por 30 minutos em 5 µg/mL. Em seguida foi feita a aquisição da imagem do gel em transiluminador de luz UV acoplada à câmera digital. Para aquisição foi utilizada uma régua sobre o gel para possibilitar a localização do fragmento alvo em relação ao marcador padrão.



Figura 3.2- Esquema do posicionamento dos *plugs* de agarose em gel de agarose para PFGE.

3.20.5 Southern Blotting

Após a aquisição da imagem do gel corado, este foi incubado por 20 minutos em HCI 0,25 N sob agitação, enxaguado em água Miili-Q e em seguida incubado por mais 20 minutos também sob agitação no tampão de transferência (1,5 M NaCl e 0,5 M NaOH). Em seguida foi transferido para membrana de nylon por capilaridade. Primeiro um papel para *blotting* (Whatman 3MM Chr) retangular é umedecido com tampão de transferência e colocado sobre uma placa de vidro, que fica apoiada sobre um recipiente de vidro contendo cerca de 1L do tampão de transferência. Assim o papel de filtro fica posicionado de forma que suas pontas permanecem em contato com tampão de transferência e sobre este papel foi colocado o gel, a membrana de nylon, parafilme nas bordas da membrana para evitar contato direto dos papéis secos com o papel de *blotting* úmido, papel para *blotting* e um bloco papel absorvente em bastante quantidade, respectivamente (Figura 3.3). Por último é colocado um peso sobre os papeis absorventes. A transferência foi feita por 12 a 16 h.



Figura 3.3- Esquema da transferência do DNA presente em gel de agarose para membrana de nylon (*Southern Blotting*).

3.20.6 Encontrando o fragmento alvo

A membrana contendo o DNA do PFGE foi incubada com sonda específica para o fragmento alvo amplificada do DNA genômico por PCR (*primers* Tb Ch1 P2 *foward* e *reverse* tabela 3.4), purificada e marcada com fosfatase alcalina utilizando o kit *Armesham AlkPhos Direct Labelling (GE Life Science)* e a detecção foi feita utilizando substrato quimioluminescente para fosfatase alcalina *CDP-Star Detection Reagent (GE Life Science)*, conforme instruções do fabricante. Em seguida filmes radiográficos (Kodak) foram expostos às membranas por cerca de 24 horas, então revelados e fixados nas soluções reveladoras e fixadoras (Kodak), respectivamente.

Com base no sinal detectado na membrana, a região central do PFGE recuperada e armazenada gel foi cortada em fatias de 0,5 cm (Figura 3.4 à esquerda) e estas foram armazenadas em tampão de estocagem (50 mM EDTA e 10 mM tris-HCl pH 8).

Existem duas maneiras diferentes de confirmar em qual das fatias está presente o fragmento alvo, uma delas seria montar um gel de agarose a partir de pequenos pedaços destas fatias (Figura 3.4 à direita) e após transferência para membrana de nylon realizar uma segunda hibridização com sonda específica. Ou realizar PCR utilizando o DNA, obtido após derreter e digerir a agarose, das fatias adjacentes à região do fragmento alvo identificado por meio da primeira hibridização utilizando os *primers* específicos (Tb Ch1 P2 *foward* e *reverse* tabela 3.4).

Figura 3.4- Esquema do fatiamento da região central do PFGE recuperada e armazenada (à direita) e montagem de um gel de agarose 1% a partir destas fatias (à esquerda) que foi transferido para membrana de nylon e esta hibridizada com sonda específica.



3.20.7 Recuperando o DNA do PFGE (protegido da luz)

Uma vez identificada a fatia que possui o fragmento alvo, um pedaço de cerca de 1 mm de grossura foi retirado de cada lado da fatia. Estes pedaços foram colocados em 50 mL de TE pH8 e incubados por 1 hora a 4 °C, em seguida o TE pH8 foi trocada e os pedaços da fatia foram incubados por mais 1 hora a 4 °C. Esta incubação foi repetida mais 2 vezes e ao final o TE pH8 foi novamente trocado e então mantidos a 4 °C overnight. Os pedaços da fatia foram colocados por duas horas em 50 mL de tampão de digestão GELase (TE pH8, 100 mM NaCl, 0,1% betamercaptoetanol) a 4 °C e em seguida foram colocados em tubo de 1,5 mL juntamente com 100 µL do tampão de digestão. Estes foram derretidos a 72 °C por 20 minutos e depois equilibrados por 5 minutos a 45 °C, ao mesmo tempo 3 unidades da enzima GELase (Epicentre) diluídas em 50 µL de tampão de digestão para GELase foram também equilibradas a 45 °C. Em seguida o tampão de digestão contendo a enzima GELase foi adicionado cuidadosamente em movimentos circulares na superfície dos pedaços de gel derretidos para melhor difusão da enzima, evitando ao máximo a quebra mecânica das moléculas de DNA.. Este foi incubado por no mínimo 1 hora e 30 minutos e no máximo 4 horas a 45 °C.

3.20.8 Preparação das lâminas

Lâminas de vidro foram mantidas em SDS 1% por no mínimo 2 h. Em seguida as lâminas foram lavadas com água destilada quente e fria, respectivamente. Depois de retirado o SDS, estas lâminas foram mantidas imersas *overnight* em mistura de ácido clorídrico e ácido nítrico na proporção de 1:2, respectivamente.

Foram então feitas 3 lavagens com água destilada para retirada dos ácidos das lâminas. Em seguida as lâminas foram lavadas por imersão em metanol e então imersas em 250 mL metanol contendo 4% de aminosilane (3 amino propil trietoxisilane/Sigma Aldrich) por 1 hora sob agitação. As lâminas foram lavadas em metanol, depois em água bidestilada por 3 vezes e mais duas vezes em etanol 95%. Finalmente estas lâminas foram secas e armazenadas em dissecador, protegidas da luz. Estas lâminas foram usadas após no mínimo 36 horas de preparo e quando bem armazenadas podem ser utilizadas dentro de 3 meses.

3.20.9 Esticando DNA sobre a lâmina (protegido da luz)

O DNA recuperado do gel é então esticado nestas lâminas pré-tratadas com aminosilane e, para evitar quebras do DNA, a ponta da ponteira utilizada para pipetar este DNA foi cortada.

O DNA foi esticado na lâmina de duas maneiras diferentes A primeira foi colocando uma lamínula 22x22 mm sobre a lâmina e 4,5 µL de DNA foi aplicado por toda a lateral da lamínula, desta forma o líquido se espalhou sob a lamínula indo de um lado para outro por capilaridade (Figura 3.5 superior). A outra maneira foi colocando 4,5 µL do DNA sobre a lamínula onde lâmina foi deitada, assim o DNA se esticou sobre todas as direções (Figura 3.5 inferior). A região contendo o DNA foi demarcada com um risco, em cada lado da lamínula, sobre a lâmina utilizando caneta com ponta de diamante.





3.20.10 Fixação e desnaturação (protegido da luz)

Após esticar o DNA na lâmina, a lamínula foi retirada e a lâmina incubada em metanol contendo 0,1% de beta-mercaptoetanol por 10 minutos. Em seguida o DNA foi desnaturado em tampão de desnaturação (etanol 70%, 0,1% beta-mercaptoetanol, 0,1 M NaOH) por 12 minutos (quanto maior o fragmento, maior deve ser o tempo de desnaturação). Então as moléculas de DNA foram fixadas por 5 minutos no mesmo tampão de desnaturação acrescido de 5% de glutaraldeído. A partir deste momento as lâminas podem ser manuseadas sem necessidade de proteção da luz.

As lâminas foram então lavadas por 2 min em etanol 70%, 95% e 100%, consecutivamente. Ao final as lâminas foram incubadas por 10 minutos em metanol contendo 0,1% de beta-mercaptoetanol e em seguidas secas naturalmente a temperatura ambiente.

3.20.11 Hibridização, Lavagem e Detecção

Após a secagem das lâminas foi feita a incubação com sondas específicas. Estas sondas possuem 10 kb e foram obtidas por meio de amplificação por PCR (*primer* tabela 3.10) a partir de DNA genômico utilizando o kit *Expand Long Template PCR System* (Roche). Após purificação estas sondas foram marcadas com biotina utilizando o kit *Biotin Nick-translation mix* (Roche).

Para cada lâmina foram utilizados 120 µL de solução de hibridização (40% formamida; 1 M NaCl; 1% SDS; 10% dextran sulfato; 5 mM tris-HCl pH7,4; 100 ng/µL de DNA de esperma de salmão-invitrogen) contendo 1 µL de cada sonda marcada. Sobre a lâmina foi montada uma câmara sobre a região que contém o DNA esticado, para tanto foi adicionada uma pequena quantidade de solução de hibridização (sem sonda) sobre os riscos feitos na lâmina que delimitam a região que possui DNA e sobre esta solução foram colocadas duas lamínulas (uma de cada lado) de 22x11 mm. Outra pequena quantidade de solução de hibridização foi colocada sobre estas lamínulas onde foi apoiada uma terceira lamínula de 22x30 mm, formando assim um espaço entre a lâmina e lamínula (Figura 3.6).

Figura 3.6- Esquema da montagem de uma câmara sobre a região da lâmina de SMARD que contém DNA.



Lamínulas de 22X11mm

A solução de hibridização contendo as sondas marcadas foi incubada por 5 minutos a 95 °C e em seguida colocada no vão entre a lâmina e lamínula. Estas lâminas foram colocadas em câmara úmida e mantidas a 37 °C *overnight*.

As lamínulas foram retiradas e as lâminas lavadas em 2xSSC (0,3 M cloreto de sódio e 30 mM citrato trisódico) contendo 1%SDS. Em seguida foram lavadas em

4xSSC contendo 40% formamida (previamente equilibrada a 45 °C) por 5 minutos a 45 °C , então lavadas em 2xSSC contendo 0,1% NP-40 seguidas de 4 lavagens consecutivas de 1 minuto em 4xSSC acrescido de 0,1% NP-40.

As lâminas foram bloqueadas com PBS-BSA 3% por 30 minutos e em seguida foram incubadas com diferentes anticorpos que foram diluídos nesta mesma solução de bloqueio. A primeira incubação foi feita por 20 minutos com neutravidina-Alexa 350 (Molecular Probes) diluída 1:15. Após duas lavagens em PBS-0,1% NP-40 foi feita a segunda incubação de 20 minutos com anti-avidina biotinilada (Vector Laboratories) diluída 1:15. Após duas lavagens foi feita a terceira incubação de 20 minutos com neutravidina novamente. Em seguida foram feitas mais duas incubações de 1 hora, sendo a guarta incubação com anti-avidina biotinilada, anti-BrdU (anticorpo monoclonal de camundongo - Becton Dickinon número de catálogo 347580) que reconhece apenas IdU e anti-BrdU (anticorpo monoconal de rato -Accurate Chemical and Scientific Corporation, número de catálogo OBT0030) que reconhece apenas CldU, todos diluídos 1:15. A quinta incubação foi feita com anticorpos secundários conjugados com diferentes fluoróforos: neutravidina-Alexa 350, anti-camundongo (Alexa flúor 568 goat anti-mouse IgG – Molecular Probes) e anti-rato (Alexa flúor 488 goat anti-rat IgG - Molecular Probes), todos diluídos 1:15. Para os ensaios que foram realizados em lâminas sem hibridização com as sondas, o DNA foi detectado com anti-DNA (90) diluído 1:15 e após lavagem foi feita incubação com anti-imunoglobulina de camundongo (Alexa flúro 350 goat antimouse IgG-Molecular Probes). Notar que anti-IdU e anti-DNA são imunoglobulinas de camundongo, portanto primeiro foi realizada a detecção de anti-IdU e antiimonuglobulina de camundongo (alexa 555) e somente depois foram realizadas as incubações com anti-DNA e anti-imunoglobulina de camundongo Alexa 350. Após lavagens, as lâminas foram montadas com ProLong Gold antifade (Invitrogen) e lamínulas de 22x30mm.

Nome do Primer	Sequência 5'- 3'
Sonda Ascl Tb crl MFa	GGAACATGCAGCACGGGGCA
Sonda Ascl Tb crl MRa	GTCTGTGTGTAGGTAGGGGGCA
Sonda Asci Tb cri MFb	GGCAGCTAAAATGCCCCCTACC
Sonda Ascl Tb crl MRb	GTAACTGCGGCTGTTGGCGC
Tb Chr1 Ascl(347)P2Fa	GAGGCTCAGTGCTTGCTGAAACC
Tb Chr1 Ascl(347)P2Ra	CCCCGTCAAACCCTCGTGGC
Tb Chr1 Ascl(347)P2Fb	TCAAAGCGACCCACACGGGC
Tb Chr1 Ascl(347)P2Rb	CAGGGCCGCCGTCCTTTGTAC
Tb Chr1 Ascl(347)P3Fa	GCTTTTTGGGGGAAATGGTTCGC
Tb Chr1 Ascl(347)P3Rb	CCTGGACTAGGAGCGTCTGG
Tbcr1 S2.1 10kb F	TGCTGAAACCCCTCGAATCC
Tbcr1 S2.1 10kb R	CACAGTGCCAACCTTTGTCG
Tbcr1 S2.2 10kb F	GGCTCAGTGCTTGCTGAAAC
Tbcr1 S2.2 10kb R	GGCCGATCCGTAGTTGCATA
Tbcr1 Smeio1 10kb F	CTAAAGTTGTTGCGACCGCC
Tbcr1 Smeio1 10kb R	GATTTCGCTGCACAAAGGCA
Tbcr1 Smeio2 10kb F	GTAACGGGAACATGCAGCAC
Tbcr1 Smeio210kb R	ATCCGGGTACCAAGCAACTG

Tabela 3.11- Primers para amplificação de sondas de 5 kb e 10 kb.

3.20.12 Aquisição de Imagens

As imagens de moléculas obtidas foram adquiridas em microscópio de fluorescência Olympus BX51 com objetiva planar apocromática de aumento de 100x com imersão em óleo, acoplada à câmera Olympus XM10 utilizando software Cell F. As imagens adquiridas foram processadas em Adobe Photoshop e fisicamente alinhadas seguindo mapa gerado pelo programa GeneQuest (DNASTAR) no Illustrador(Adobe).

4 RESULTADOS

Neste trabalho será abordado o controle da replicação do DNA em *T. cruzi* e também o perfil de replicação da região central do cromossomo I de *T. brucei*, que estão separados em duas seções diferentes.

4.1 Controle da Replicação em Trypanosoma cruzi

4.1.1 Obtenção do anticorpo contra TcMcm7

Com a finalidade de obter anticorpos contra a proteína TcMcm7, este gene foi clonado (lócus Tc00.1047053508707.210 (112) no vetor pMALc2x. Em seguida foi feita a transformação do vetor pMALc2x –TcMcm7 em bactéria *E. coli* Bl21 DE3 (*Rosetta*) e a proteína recombinante fundida à MBP (*Maltose Binding Protein*) foi expressa após adição de IPTG (Figura 4.1 A). A proteína expressa rTcMcm7-MBP apresentou altura próxima ao esperado de 131 kDa, que corresponde a aproximadamente 82 kDa de TcMcm7 e 49 kDa de MBP. Após expressão em larga escala, as bactérias foram lisadas em alta pressão, centrifugadas e a proteína recombinante TcMcm7-MBP que permaneceu solúvel foi purificada em coluna de amilose (Figura 4.1 B).

A proteína recombinante TcMcm7-MBP purificada foi utilizada para a obtenção de anticorpos específicos, feito em colaboração com Dr. Osvaldo Sant'anna do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan. O anticorpo obtido foi utilizado em ensaio de *immunoblotting*, onde extrato total da forma epimastigota de *T. cruzi* foi imobilizado na membrana após separação em SDS-PAGE. A figura 4.1 C mostra uma banda específica na altura esperada para TcMcm7 de aproximadamente 82kDa, que não está presente no soro pré-imune.





Em (A) gel de SDS-PAGE corado com azul de coomassie de extrato de proteína de bactérias não induzidas (-) ou induzidas (+) com ITPG, para expressão da proteína recombinante TcMcm7-MBP. (B) gel de SDS-PAGE da purificação da proteína recombinante TcMcm7-MBP em coluna de amilose. A amostra antes de ser aplicada na coluna (pré-coluna), a amostra que passou pela coluna sem interagir com a mesma (*flow through*), a amostra que saiu da coluna juntamente com tampão de lavagem (lavagem) e a fração que saiu da coluna após adição de amilose (eluato) foram submetidas a SDS-PAGE que foi corado com azul de Coomassie. Em (A) e (B) as setas indicam a altura da proteína recombinante e à esquerda dos géis está indicada a altura do padrão de peso molecular. (C) *Immunoblotting* de soro pré-imune e soro de camundongo imunizado com rTcMcm7-MBP em extrato total de proteínas da forma epimastigota de *T. cruzi*.

4.1.2 TcOrc1/Cdc6, TcPCNA e TcMcm7 são expressas durante todo ciclo celular da forma epimastigota de T. cruzi

Para análise da expressão de diferentes proteínas nas diversas fases do ciclo celular, as formas epimastigotas foram tratadas por 24 horas com hidroxiuréia para sincronização do ciclo celular. As células foram lavadas, uma parte foi coletada para o ponto 0h (logo após a retirada da HU) de epimastigotas em G1/S e outra parte das células foram reincubadas no meio de cultura. Pontos foram coletados após 6h e 14h de incubação para obtenção de células em S e G2, respectivamente. A figura 4.2A mostra a leitura da intensidade de fluorescência de iodeto de propídeo em citômetro de fluxo para determinação da fase celular de cada ponto.

Nosso laboratório já havia mostrado que TcOrc1/Cdc6 é expressa durante todo ciclo celular de epimastigota (86) permanecendo sempre ligado ao DNA, de forma que não apresenta aparente participação no controle da replicação, como ocorre em outros organismos como *S. creviseae* (34). Desta forma, foi feita a análise da expressão de TcMcm7, que compõe o complexo de pré-replicação, assim como de TcPCNA, presente na maquinaria de replicação, no ciclo celular de epimasigota para

avaliar a possível participação destas proteínas no controle da replicação. Como pode ser visto nas figuras 4.2 B e C, TcOrc1/Cdc6 e TcMcm7 são expressas em todas as fases do ciclo celular de epimastigota, não havendo mudança nessa expressão. Já TcPCNA também é expressa durante todo o ciclo, havendo aumento de sua expressão ao entrar na fase S.



Figura 4.2- Expressão de TcOrc1/Cdc6, TcPCNA e TcMcm7 presente em todas as fases do ciclo celular de epimastigota.

(A) As formas epimastigotas foram sincronizadas por 24h com hidroxiuréia (HU) e pontos 0h (G1/S), 6h(S) e 14h(G2) após a retirada da HU foram coletados, fixados, corados com iodeto de propídeo para quantificação do DNA (2C e 4C) por citometria de fluxo. Exp=células em crescimento exponencial, não sincronizadas. **(B)** *Immunoblotting* dos anticorpos anti-TcOrc1/Cdc6, TcMcm7, TcPCNA e TcGAPDH em extrato total de proteínas de epimastigotas nas diferentes fases do ciclo celular (G1/S, S e G2). **(C)** Quantificação da intensidade das bandas utilizando o programa Image J, que foram normalizadas pela intesidade de TcGAPDH. O gráfico indica média e desvio padrão de 3 experimentos independentes.

4.1.3 TcOrc1/Cdc6 e TcMcm7 permanecem ligadas ao DNA durante todo o ciclo celular de epimastigota

Para determinar a interação de TcMcm7 com o DNA no ciclo celular e confirmar a ligação de TcOrc1/Cdc6 ao DNA, uma vez que ambas permanecem expressas em todas as fases do ciclo celular, foi feita a extração diferencial de proteínas solúveis e proteínas ligadas ao DNA nas células sincronizadas . Neste ensaio, as células foram

primeiramente tratadas com tampão contendo detergente para extração das proteínas solúveis e posteriormente tratadas com DNAse para que as proteínas que interagem com DNA tornem-se solúveis. A figura 4.3 A mostra os controles para as frações de proteínas solúveis (eIF5A) e para as frações de proteínas ligadas ao DNA (histona H3). Como pode ser visto na figura 4.3 B, TcOrc1/Cdc6 e TcMcm7 permanecem ligadas ao DNA nas diferentes fases do ciclo celular de epimastigota, não indicando participação no controle da replicação do DNA em epimastigotas.

Figura 4.3- TcOrc1/Cdc6 e TcMcm7 estão ligadas ao DNA em todas as fases do ciclo celular de epimastigota.



Em (A) epimastigotas foram submetidos a extração diferencial de proteínas solúveis e proteínas ligadas ao DNA. *Pellet* das células foi tratado com tampão de extração e após centrifugação o sobrenadante foi coletado como fração I de proteínas solúveis (1), em seguida foi repetida a extração onde foi obtida a segunda fração de proteínas solúveis (2). O *pellet* foi então tratado com DNAse I e após centrifugação o sobrenadante foi coletado como fração I de proteínas ligadas ao DNA (3), esse passo foi repetido mais uma vez e a fração II de proteínas ligadas ao DNA foi coletada (4). As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membrana, onde foi realizado o ensaio de *immunoblotting* dos controles de proteínas ligadas ao DNA (histona H3). Em (B) *imunoblotting* de TcOrc1/Cdc6 e TcMcm7 em *pool* das duas frações de proteínas ligadas ao DNA de epimastigotas nas diferentes fases do ciclo celular (G1/S, S e G2), obtidos após sincronização com hidroxiuréia (HU).

4.1.4 TcOrc1/Cdc6 e TcPCNA são expressas nas diferentes formas do ciclo de vida de T. cruzi, enquanto TcMcm7 é expressa apenas nas formas replicativas.

Em seu ciclo de vida, *T. cruzi* apresenta formas replicativas que não infectam e formas infectivas que não replicam. Para avaliar a participação das proteínas de préreplicação e replicação no controle da replicação do DNA durante o ciclo de vida de *T. cruzi*, ensaios de *immunoblotting* foram realizados em extrato proteicos totais das formas replicativas (amastigota e epimastigota) e não replicativas (tripomastigota e tripomstigota metacíclico). TcOrc1/Cdc6 foi encontrada em todas as formas de vida de *T.cruzi* (figura 4.4 A e B) e, assim como na forma replicativa epimastigota, apresentou localização nuclear em 100% das formas tripomastigotas não replicativas (n=300)(figura 4.4 C). A expressão de TcMcm7 é encontrada apenas nas formas replicativas, enquanto TcPCNA é expressa em todos os estágio de vida (figura 4.4 D). Assim, a falta de TcMcm7 nas formas não replicativas pode estar impedindo a replicação do DNA nestas células.

4.1.5 TcOrc1/Cdc6, TcMcm7 e TcPCNA estão ligadas ao DNA apenas nas formas replicativas

Tanto nas formas replicativas quanto nas formas não replicativas há expressão de TcOrc1/Cdc6 e TcPCNA, desta forma fomos avaliar como é a interação destas proteínas com o DNA nos diferentes estágio do ciclo de vida de *T. cruzi*, por meio da extração diferencial de proteínas solúveis e proteínas ligadas ao DNA.

Já era de nosso conhecimento que TcOrc1/Cdc6 está ligada ao DNA na forma epimastigota (86), e esta interação de igual modo ocorre na forma replicativa amastigota (figura 4.5 B). Porém nas formas não replicativas TcOrc1/Cdc6 permaneceu na fração solúvel, não ligada ao DNA (Figura 4.5 C e D), sendo assim uma forma adicional do impedimento da replicação em tripomastigota e tripomastigota metacíclico. Da mesma forma a proteína TcPCNA da maquinaria de replicação foi encontrada ligada ao DNA apenas nas formas replicativas (figura 4.5 C e D). Já TcMcm7, presente apenas nas formas replicativas, também interage com o DNA em amastigota e epimastigota (figura 4.5 A e B). As proteínas Tchsp70 e histona H4 foram utilizadas como controle de proteínas presentes apenas na fração solúvel e ligada ao DNA, respectivamente (Figura 4.5 A, B, C e D).

Figura 4.4- Enquanto TcOrc/Cdc6 e TcPCNA são expressas em todos os estágio de vida de *T. cruzi*, TcMcm7 é expresso apenas nas formas replicativas.



(A) *Immunoblotting* em extrato total das formas replicativas amastigota (Ama) e epimastigota (Epi) e das formas não replicativas tripomastigotas (Tripo) e tripomastigotas metacíclicos (Meta), utilizando os anticorpos contra TcOrc1/Cdc6 e TcGAPDH. (B) A intensidade das bandas em (A) foram quantificadas por meio do programa Image J e a quantificação de TcOrc1/Cdc6 foi normalizada pela quantificação de TcGAPDH. O gráfico mostra média e desvio padrão de três experimentos independentes. (C) Imunofluorescência utilizando anti-TcOrc1/Cdc6 em forma tripomastigota, o DNA foi corado com DAPI. Nos diferentes painéis pode ser visto (a) fase, (b) DAPI, (c) TcOrc1/Cdc6 e (d) a sobreposição de DAPI em azul e TcOrc1/Cdc6 em vermelho. K-cinetoplasto e N-núcleo. A barra branca em (a) indica 1µm. (D) *Immunoblotting* em extrato total das formas replicativas amastigota (Ama) e epimastigota (Epi) e das formas não replicativas tripomastigotas (Tripo) e tripomastigotas metacíclicos (Meta), utilizando os anticorpos contra TcMcm7, TcPCNA e TcGAPDH.



Figura 4.5- TcOrc1/Cdc6, TcMcm7 e TcPCNA estão ligadas ao DNA apenas nas formas replicativas epimastigota e amastigota.

As diferentes formas de vida de *T. cruzi* foram submetidas a extrato diferencial de proteínas solúveis (1 e 2) e proteínas ligadas ao DNA (3 e 4) da mesma forma que na figura 4.3. Os extratos foram separados por SDS-PAGE e transferidos para membrana para realização de *immunoblotting* utilizando os anticorpos contra TcOrc1/Cdc6, TcMcm7, TcPCNA, Tchsp70 (controle de proteína presente apenas nas frações solúveis) e histona H4 (controle de proteína presente apenas nas frações insolúveis) nas formas replicativas (A) epimastigota e (B) amastigota, e nas formas não replicativas (C) tripomastigota metacíclico e (D) tripomastigota.

4.2 Perfil da replicação da região central do cromossomo I de Trypanosoma brucei

4.2.1 A técnica de SMARD

A técnica de SMARD (Single Molecule Analysis of Replicated DNA) foi desenvolvida no laboratório do Dr. Carl Schildkraut da Albert Einstein College of Medicine (NY-EUA) por seu aluno de pós doutorado Paolo Norio (113). Esta técnica permite visualizar moléculas individuais de DNA replicados na presença de dois análogos de timidina. Assim SMARD consiste na incorporação consecutiva de dois análogos de timidina, o IdU - iododeoxiuridina (sempre em vermelho) e CldUclorodeoxiuridina (sempre em verde), em cultura de células em crescimento exponencial não sincronizadas, seguida de digestão do DNA com enzima de restrição. O DNA fragmentado é então separado em pulsed field gel electrophoresis (PFGE), transferido para membrana de nylon e esta é hibridizada com sonda específica para identificação do fragmento alvo. O fragmento é então recuperado do gel e a agarose é derretida e digerida, permitindo assim que o DNA seja usado em lâminas pré-tratadas com aminosilane onde as moléculas de DNA são esticadas. Finalmente é feita a incubação com sondas específicas para identificação do fragmento alvo na lâmina seguida da detecção destas sondas, assim como a detecção dos análogos de timidina incorporados (IdU e CldU). A figura 4.6 A ilustra o procedimento da técnica de SMARD.

Utilizando esta técnica é possível encontrar: regiões de origem de replicação, que é determinada por uma marcação vermelha rodeada por marcação verde (figura 4.6 B); regiões de encontro de duas forquilhas de replicação culminando em terminação de replicação, no qual se vê uma região verde rodeada por marcação vermelha (figura 4.6 B); e ainda direção da forquilha de replicação no sentido 5'-3'ou 3'- 5', sendo o movimento determinado por marcação vermelha seguida de marcação verde (figura 4.6 B). A orientação das forquilhas pode ser obtida utilizando sondas dispostas de forma assimétrica ao longo do fragmento, permitindo a identificação do seu sentido 5'- 3'.



Figura 4.6- Ilustração da técnica SMARD.

(A) Cultura de células exponenciais não sincronizadas são incubadas por 40 minuto com IdU seguida de uma segunda incubação de 40 minutos com CldU (ambos análogos de timidina). As células são colocadas em *plugs* de agarose, lisadas e as proteínas digeridas com proteinase K. O DNA é então digerido com a enzima de restrição *Asc* I, e os fragmentos são separados em PFGE. O gel é transferido para membrana de nylon, incubado com sonda específica para identificação do fragmento alvo. O DNA é recuperado do gel e a agarose é derretida e digerida com a enzima GELase. As moléculas de DNA recuperadas são então esticadas em lâminas pré-tratadas com aminosilane, incubadas com sondas específicas para o fragmento alvo seguida da detecção destas sondas e dos análogos de timidina, IdU e CldU. (B) Diferentes padrões de incorporação que permitem identificar: origens de replicação no sentido 5'- 3'ou 3'- 5' (forquilha movendo do vermelho para verde) e também terminação de replicação (marcação verde rodeada por marcação vermelha). Adaptado de (114)

4.2.2 SMARD em Trypanosoma brucei

Durante o ano de 2010 realizei estágio sanduíche no laboratório do Dr. Carl Schildkraut a fim de aprender a técnica de SMARD e então padronizá-la em nosso laboratório em nosso modelo de estudo *T. brucei*.

4.2.2.1 Incorporação IdU e CIdU

Para os ensaios de SMARD são feitos dois pulsos consecutivo dos análogos de timidina IdU e CldU, e o tempo de pulso varia conforme o tempo de S da célula. Em célula de embrionárias de camundongo, onde o tempo de S é de cerca de 8 horas, são feitos dois pulsos de 4 horas cada. As formas procíclicas de *T. brucei* têm cerca de 90 minutos (84) de fase S, desta forma foram realizados dois pulsos consecutivos de 40 minutos. A figura 4.7 mostra uma célula em que houve a incorporação dos dois análogos de timidina.



Figura 4.7- Incorporação de análogos de timidina em T. brucei procíclico.

Após 40 minutos de pulso de cada análogo de timidina (IdU e CIdU), as células foram fixadas com metanol e o DNA desnaturado com HCI, seguida da detecção dos análogos com seus respectivos anticorpos anri-IdU (em vermelho) e anti-CIdU (em verde). O DNA foi corado com DAPI (em azul), a barra branca indica 2µm. N-núcleo e k-cinetoplasto.

4.2.2.2 Isolando o cromossomo I

De forma geral SMARD é feito com fragmentos de DNA com cerca de 300 kb gerados por digestão com enzima de restrição de sítios raros, tais como *Pme* I,*Swa* I, *Fse* I e *Asc* I. Porém durante o estágio sanduíche um dos pós-doutores estava padronizando esticar fragmentos de 1 Mb. Desta forma pensamos em isolar o cromossomo I para realizar a análise do perfil das forquilhas de replicação de todo esse cromossomo. Para isso nos foi gentilmente concedida a cepa sequenciada de *T. brucei* TREU 927 pelo Dr. Richard McCulloch da Universidade de Glasgow. A

figura 4.8 A mostra o genoma dos cromossomos da ordem de megabase (Mb) nesta cepa, que é constituído por 11 cromossomos. O cromossomo I, com cerca de 1,1 Mb (Figura 4.8 B), é o menor entre estes cromossomos e foi escolhido justamente por seu tamanho.



Figura 4.8- Genoma haploide de Trypanosoma brucei TREU 927.

São 11 os cromossomos na ordem de Mb em *T. brucei* TREU 927, que somam cerca de 25 Mb ao todo. Em (A) uma representação esquemática dos 11 cromossomos e em (B) tabela com o tamanho de cada cromossomo *T. brucei*.

Após os pulsos de IdU e CldU, as células foram montadas em *plugs* de agarose *low-melting* em concentração final de 0,5%, na qual cada *plug* continha 5x10⁷ células. Estas células foram lisadas e as proteínas digeridas, restando apenas DNA nestes *plugs*. Em seguida o DNA foi submetido ao gel de campo pulsado (PFGE - *pulsed field gel electrophoresis*), no qual um *plug* foi colocado ao lado do marcador de tamanho e outras 4 *plugs* foram colocados justapostos a fim de cortar e armazenar sua região central antes de realizar a coloração do gel com brometo de etídeo (como mostra a figura 3.2 do material e métodos), para posterior recuperação do DNA que será esticado sobre a lâmina. A figura 4.9 A mostra o PFGE com o marcador e apenas o primeiro *plug*.



610 450

Figura 4.9- Isolamento do cromossomo I de *T. brucei* forma procíclica.

(A) PFGE corado com brometo de etídeo contendo o marcador de tamanho *S. cereviseae chromosomal DNA* (Bio-Rad) e DNA genômico da forma procíclica de *T. brucei* após os pulsos de IdU e CIdU. A corrida foi feita conforme os seguintes parâmetros no aparelho *CHEF Mapper* (Bio-Rad): gel de agarose *low-melting* 1%, *two-state program, included angle* 120°, 6V/cm, pulso inicial de 1 minuto 8.8 segundos, pulso final de 54.49 segundos, corrida de 40 horas em 0,5x TBE. As letras a, b e c indicam as fatias cortadas deste gel para recuperação do cromossomo I. A seta aponta para a fatia da qual o DNA foi recuperado. (B) Gel de agarose 1% da reação de PCR utilizando *primers* específicos (TbCh1P2 F e R, tabela 3.4) para identificação do cromossomo I nas fatias a, b e c do PFGE em A.

A região central referente aos quatro *plugs* submetidos ao PFGE foi fatiada e o DNA das fatias a, b e c foi utilizado em reação de PCR com sondas específicas para identificação do cromossomo I. Como pode ser visto na figura 4.9 B, os diferentes homólogos do cromossomo I estão localizados nas fatias a e b, de forma que optamos em utilizar o cromossomo da fatia b que é menor, cuja banda encontra-se isolada das demais bandas.

4.2.2.3 Esticando cromossomo I sobre a lâmina

O cromossomo I isolado por PFGE foi recuperado e após derreter e digerir a agarose, o DNA resultante foi esticado em lâminas de vidro pré-tratadas com aminosilane. São duas as formas de esticar o DNA na lâmina, como mostra a figura 4.10 A. A forma denominada *side stretch* é feita aplicando o DNA de um lado da lâmiínula que está sobre a lâmina, assim o DNA irá se mover de um lado para outro da lâmina. A outra maneira é a *drop stretch*, onde uma gota de DNA é colocada sobre a lamínula e a lâmina é deitada sobre esta, fazendo com que o DNA se espalhe em todas as direções.

Figura 4.10- Cromossomo I de *T. brucei* esticado na lâmina.



(A) Diferentes formas de esticar o DNA sobre a lâmina pré-tratada com aminosilane, onde 1 indica a região onde o DNA é aplicado tendo maior concentração de DNA e 2 a região para onde o DNA migra com menor concentração de DNA. As setas indicam a direção de espalhamento do DNA sob a lamínula. (B) Cromossomo I corado com yoyo-1 (Invitrogen) esticado sobre a lâmina (*drop* stretch) nas regiões com maior (1) e menor (2) concentração de DNA. (C) Fragmentos de 200 kb corados com yoyo-3 esticados sobre a lâmina nas regiões com maior (1) e menor (2) concentração de DNA. Em (B) e (C) as setas brancas indicam região de DNA aglomerado, 1 e 2 indicam as regiões com diferentes concentrações de DNA ilustradas em A.

As duas formas de esticar o DNA sobre a lâmina foram utilizadas, porém em ambas o resultado não foi satisfatório. Como pode ser visto na figura 4.10 B, o cromossomo I ficou concentrado na região de aplicação do DNA (1), e devido ao grande tamanho as moléculas estas ficaram aglomeradas, como indica a seta branca, não se esticando ao longo da lâmina. Nas regiões mais distantes do local de aplicação do DNA (2), foi encontrado apenas pequenos fragmentos do cromossomo I, o que indica que além de não se espalhar sobre a lâmina, o DNA se fragmentou muito, impossibilitando a análise de um fragmento tão grande como 1 Mb. A figura 4.10 C mostra um exemplo de como deve ser uma lâmina com boa distribuição de DNA esticado, utilizando como exemplo um fragmento de cerca de 200 kb. Na região 1 também é possível observar DNA aglomerado, contudo ainda há muito DNA estica ao redor, e mesmo em regiões mais distantes (2) é possível ver boa quantidade de DNA integro esticado. Foram feitas algumas tentativas de esticar o DNA na lâmina, utlizando amostras menos concentradas para tentar evitar que as moléculas se entrelaçassem e ficassem aglomeradas, porém o resultado permaneceu insatisfatório. Desta forma partimos em busca de fragmentos menores do cromossomo I para serem analisados.

4.2.2.4 Fragmento de 347 kb do cromossomo I de T. brucei

Na impossibilidade de esticar todo o cromossomo I, este foi então digerido com a enzima de corte raro Asc I. A figura 4.11 A (superior) mostra os sítios de restrição para a enzima Asc I ao longo do cromossomo I e o fragmento de 347 kb (indicado pela seta) na região central deste cromossomo, que foi escolhido para as análises por SMARD.

A fim de identificar este fragmento nas lâminas de SMARD e também determinar a sua orientação 5' - 3', foram desenhadas três sondas para FISH de sequências específicas para o cromossomo I. Estas sondas possuem 10 kb e estão dispostas de forma assimétrica ao longo do fragmento de 347 kb (figura 4.11 inferior).



Figura 4.11- Fragmento de 347 kb obtido por digestão do cromossomo I.

Na parte superior estão os sítios de restrição ao longo do cromossomo I de *T. brucei*. A seta indica o fragmento escolhido para as análises por SMARD. Na parte inferior está ilustrada a disposição das sondas para FISH de 10kb (em azul) que identificam o fragmento de 347 kb.

4.2.2.5 Amplificação e marcação das sondas

As sondas de 10 kb para FISH foram obtidas por meio de amplificação em reação de PCR utilizando o kit *expand long template PCR system* (Roche). A figura 4.12 A ilustra os pares de *primers* desenhados para amplificação das sondas de 10 kb (setas em vermelho), também estão ilustrados *primers* internos (setas laranjas) que permitem a amplificação de dois fragmentos de 5 kb nos casos em que a amplificação da sequência de 10 kb não foi possível de ser obtida. Como pode ser visto na figura 4.12 B, a amplificação das sequências foi realizada na presença de três tampões diferentes disponibilizados no kit de amplificação e apenas a sonda 3 foi amplificada na altura de 10 kb (indicado pela seta). Desta forma foi realizada nova reação de PCR para amplificar os dois fragmentos de 5 kb para as sondas 2 e meio. Porém apenas um dos fragmentos de 5 kb da sonda meio foi amplificado e os dois fragmentos de 5 kb da sonda 2 foram obtidos (figura 4.12 C).



Figura 4.12- Amplificação sonda 3 de 10 kb e fragmentos de 5 kb das sondas meio e 2.

(A) Ilustração das sondas de 10 kb (barra azul) e par de *primers* indicados pelas setas para amplificação das sondas de 10 kb (setas vermelhas) e *primers* internos (setas laranjas) para amplificação dos fragmentos de 5 kb. (B) Gel de agarose corado com brometo de etídeo das reações de PCR para as sondas de 10 kb (e, meio e 3) na presença dos diferentes tampões (1, 2 e 3) disponibilizados pelo kit de amplificação. (C) Gel de agarose das amplificações dos fragmentos de 5 kb das sondas meio e 2 na presença de três diferentes tampões (1, 2 e 3). Em (B) e (C) foi utilizado marcador lambda *Hind* III e as setas apontam para os fragmentos na altura esperada. *Primers* conforme tabela 3.11, em (B) par de *primers*: TbChr1Ascl(347)P2Fa e TbChr1Ascl(347)P2Rb para sonda 2; Sonda Ascl Tb crl MFa e Sonda Ascl Tb crl MRb para sonda meio; TbChr1Ascl(347)P3Fa e TbChr1Ascl(347)P2Rb para sonda Ascl Tb crl MRa para sonda meio 5k a; Sonda Ascl Tb crl MFb e Sonda Ascl Tb crl MRb para sonda meio 5 kb b; TbChr1Ascl(347)P2Fa e TbChr1Ascl(347)P2Ra para sonda 2 5 kb a; TbChr1Ascl(347)P2Fb e TbChr1Ascl(347)P2Fa para sonda 2 5 kb a; TbChr1Ascl(347)P2Fb e TbChr1Ascl(347)P2Fb para sonda 2 5 kb a; TbChr1Ascl(347)P2Fb para sonda 2 5 kb b;

Na tentativa de amplificar a sonda meio e melhorar a sonda 2, novos pares de *primers* foram desenhados. Como está ilustrado na figura 4.13 A, dois pares de p*rimes* foram obtidos e estão indicados pelos pares de seta verde e rosa. Desta forma foram feitas novas reações de PCR na presença de três diferentes tampões, com as quatro combinações possíveis dos *primers* (a, b c e d da figura 4.13 A). Na figura 4.13 B estão as amplificações da sonda 2 de 10 kb que foi obtida em todas as reações, já a sonda meio de 10 kb foi amplificada apenas com os *primers* da combinação d com os três diferentes tampões, porém melhor amplificação foi na presença do tampão 1(figura 4.13 C).



Figura 4.13- Amplificação sonda 2 e meio de 10 kb.

(A) Esquema dos pares de *primers* (setas verdes e rosas) para nova tentativa de amplificação das sondas de 10 kb (sonda 2 e meio), na qual a, b, c e d indicam as diferentes combinações de *primers* para amplificar o fragmento de 10 kb. (B) e (C) Géis de agarose corados com brometo de etídeo das reações de PCR na presença dos tampões 1, 2 e 3. Com os pares *primers* a, b, c e d indicados em A. M-marcador lambda *Hind* III. As setas apontam para o fragmento amplificado na altura esperada. Em (B) sonda 2 com pares de *primer:* (a) Tbcr1 S2.1 10kb F e Tbcr1 S2.1 10kb R; (b) Tbcr1 S2.2 10kb F e Tbcr1 S2.2 10kb R; (c) Tbcr1 S2.1 10kb F e Tbcr1 S2.2 10kb R; (d) Tbcr1 S2.2 10kb F e Tbcr1 S2.1 10kb F e Tbcr1 S2.2 10kb R; (d) Tbcr1 S2.2 10kb F e Tbcr1 S2.1 10kb F e Tbcr1 S2.1 10kb F e Tbcr1 S2.2 10kb R; (d) Tbcr1 S2.2 10kb F e Tbcr1 S2.1 10kb F e Tbcr1 S2.1 10kb R; (d) Tbcr1 S2.2 10kb F e Tbcr1 S2.1 10kb F e Tbcr1 S2.1 10kb R; (d) Tbcr1 S2.2 10kb R; (d) Tbcr1 S2.2 10kb F e Tbcr1 S2.1 10kb F e Tbcr1 S2.2 10kb R; (d) Tbcr1 S2.2 10kb F e Tbcr1 S2.1 10kb F e Tbcr1 S2.2 10kb R; (d) Tbcr1 S2.2 10kb F e Tbcr1 S2.1 10kb F e Tbcr1 S2.2 10kb R; (d) Tbcr1 S2.2 10kb F e Tbcr1 S2.2 10kb F

Após finalmente obter as três sondas de 10 kb amplificadas, estas foram purificadas (figura 4.14 A) e marcadas com biotina (figura 4.14 B) por meio do kit *biotin nick translation mix* (Roche). As sondas marcadas foram então utilizadas em hibridização *in situ* nas lâminas contendo o DNA esticado para identificar e definir a orientação 5'- 3' do fragmento de 347 kb do cromossomo I das formas procíclicas de *T. brucei.*





Géis de agarose corados com brometo de etídeo. Em **(A)** sondas de 10 kb 2, meio e 3 purificadas, que foram utilizadas na marcação (em **B**) por *nick translation* com biotina.

4.2.3 Fragmento de 347 kb da região central do cromossomo I de T. brucei

A obtenção do fragmento de 347 kb do cromossomo I foi feita por meio da digestão de *plugs* de DNA, previamente incorporados com os dois análogos de timidina, com a enzima de restrição *Asc* I. O DNA foi então separado em PFGE, no qual um *plug* foi posicionado ao lado do marcador e outros quatro *plugs* foram colocados justapostos, de forma que após a corrida a região central destes *plugs* foi cortada e armazenada antes da coloração com brometo de etídeo. A figura 4.15 mostra o PFGE corado com brometo de etídeo.

Este gel foi transferido para membrana de nylon e esta foi incubada com sonda específica para identificar o fragmento de 347 kb. Esta sonda específica contém 900 bp e foi obtida por meio de amplificação por PCR a partir do DNA genômico das formas procíclicas de *T. brucei* TREU 927 (*primers* TbChr1P2 F e R, tablea 3.4 de material e métodos). Como pode ser visto na figura 4.15 B duas bandas em alturas diferentes, que correspondem aos diferentes cromossomos homólogos, foram encontradas. Porém apenas a fatia contendo o fragmento mais próximo a altura esperada de 347 kb foi utilizada (fatia c, figura 4.15 A e B), uma vez que a disposição das sondas hibridizadas em lâminas foram desenhadas baseada neste comprimento de molécula.


Figura 4.15- Identificação e isolamento do fragmento de 347 kb do cromossomo I de *T.brucei* da forma procíclica.

(A) O DNA genômico das formas procíclicas, previamente incorporados com IdU e CIdU e digerido com a enzima de restrição Asc I, foi submetido a PFGE no equipamento CHEF Mapper (BioRad) conforme os seguintes parâmetros: programa two-state, 120° included angle, 6v/cm, pulso inicial de 18s, pulso final de 33s, corrida de 30h em TAE 0,5X com rampa linear, gel de agarose 0,8%. O retângulo amarelo indica a região de onde foi recuperado o DNA para esticar nas lâminas; P- padrão de corrida para PFGE Lambda Ladder PFGE marker (NEB); 1-DNA correspondente a um plug; 2-DNA que restou das bordas de 4 plugs cuja região central foi cortada e armazenada antes da coloração do brometo de etídeo, para recuperação dos fragmentos de DNA desejados. (B) O gel de A foi transferido para membrana de nylon e esta foi incubada com sonda específica para o fragmento de 347 kb. (C) As fatias a, b e c do gel em A e demonstradas no southern em B foram derretidas e a agarose digerida. O DNA resultante foi utilizado em reação de PCR para identificar com precisão em qual fatia o fragmento alvo está localizado. Em (B) e (C) as setas amarelas indicam a região onde está localizado o fragmento de 347 kb.

Com a finalidade de confirmar a fatia em que o fragmento de 347 kb está localizado, as fatias do PFGE foram derretidas e a agarose digerida. Foi feito PCR utilizando par de *primers* específicos (os mesmo utilizados na amplificação da sonda para *southern*) para este fragmento utilizando o DNA destas fatias. Como pode ser visto na figura 4.15 C, o fragmento está localizado na fatia c que foi utilizado na realização das lâminas de SMARD.

4.2.4 Identificação de uma nova origem de replicação no cromossomo I de T. brucei

Após a identificação e isolamento do fragmento a ser analisado, as moléculas de DNA foram esticadas em lâminas de vidro pré-tratadas com aminosilane e incubadas com as três sondas específicas marcadas com biotina (figura 4.15 A, barras azuis).

Em seguida foi feita a detecção destas sondas (em azul), assim como dos análogos de timidina IdU (em vermelho) e CIdU (em verde). A figura 4.15 (B a F) mostra as moléculas obtidas.

Nas moléculas da figura 4.15 B pudemos identificar uma origem de replicação, que é determinada por uma região vermelha rodeada por marcação verde. As setas amarelas apontam a transição das incorporações indicando o sentido da forquilha. Portanto esta origem de replicação identificada está localizada entre as duas sondas de 10 kb (2 e meio). Ao fazermos a análise da sequência de DNA nesta região, encontramos uma segmento de 22 kb que contém uma sequência repetitiva de 123 bp (consenso 5` AAC CGA AAC CAT CAT GGA CGA GGC ACC ATG CGC CCC GGA GGA CTT CCT AGC GGA GGA ATC CCA GCA ACA CAC TGC GAG GAG TGA AGC TGA CAT TGA TGA AGA GCA GCA GCC GCA GGA GCA GCA 3`) que apresenta 30,89% de A, 30,08% de G, 28,46% de C e 10,57% de T. Esta origem de replicação identificada foi denominada de ORI 1.

Além da identificação de ORI 1, também foi possível observar que este fragmento está sendo replicado por forquilhas provenientes de origens presentes na região 3' adjacente ao fragmento de 347 kb como mostram as moléculas com terminação de replicação na figura 4.15 C. As terminações de replicação são determinadas por região verde rodeada por marcação vermelha. Deste modo as moléculas em C mostram uma forquilha proveniente da região 5', que pode ser disparo de ORI 1 ou de origens na região 5` fora do fragmento analisado, e outra forquilha proveniente de origens na região 3' adjacente ao fragmento analisado (marcação vermelha à direita das moléculas).

A confirmação de que este fragmento também pode ser replicado por forquilha proveniente de origens na região 5`, fora do fragmento de 347 kb, pode ser visto na figura 4.15 F onde as terminações de replicação estão sobre ORI 1, indicando que esta origem não foi disparada e que a forquilha vindo de 5' (marcação vermelha à esquerda do fragmento) é proveniente de origens na região 5' adjacente.

Assim podemos observar que o fragmento de 347 kb é replicado por forquilhas provenientes das regiões 5' e 3' adjacentes e também pelo disparo de ORI 1. Além do mais podem ocorrer combinações variadas destas forquilhas para a duplicação desta região como está indicado na figura 4.15 G. Assim todas as forquilhas podem estar envolvidas na replicação (moléculas em 4.15 C), enquanto outras podem não participar da duplicação desta região. Na molécula 1 (4.15 B) e nas moléculas em

4.15 D a forquilha progride na direção 5'- 3', mostrando que a forquilha vinda a partir de origens à 3` (ORIs 3`) não participaram da duplicação destas moléculas. Também podemos afirmar que a forquilha proveniente da região 5' (ORIs 5`) não participam da duplicação nas moléculas 2 (4.15 B) e 4.15 E. E como já mencionado antes ORI 1 pode não ser disparada como mostram as moléculas em 4.15 F.

Portanto diferentes combinações de forquilhas de replicação são responsáveis em duplicar a região central do cromossomo I, podendo ainda não estar ocorrendo o disparo de algumas origens, como é o caso de ORI 1.

Figura 4.16- O fragmento de 347 kb pode ser replicado por forquilhas provenientes de três origens de replicação diferentes, incluindo uma origem dentro deste fragmento.



(A) Representação esquemática do fragmento de 347 kb do cromossomo I contendo alguns genes conhecidos (retângulos laranjas) e também ORI 1 que contém uma sequência repetitiva de 123 bp (retângulo vermelho). As sondas utilizadas na identificação deste fragmento estão abaixo em azul e as forquilhas de replicação provenientes de ORI 1 ou de origens nas regiões adjacentes 5' e 3' estão indicadas como setas amarela acima do fragmento. De (B) a (F) as setas amarelas indicam a transição da incorporação de IdU (vermelho) e CIdU (verde) apontando o sentido da froquilha, as linhas azuis delimitam a região das sondas específicas que foram utilizadas no alinhamento das moléculas. (G) A replicação do fragmento de 347 kb pode ser realizada por forquilhas provenientes de diferentes origens: ORI 1, origens nas regiões adjacentes à 5' (ORIs 5') e à 3' (ORIs 3') que estão indicadas como (+) participante ou (-) não participante da replicação do fragmento.

4.2.5 TbOrc1/Cdc6 liga ORI 1 in vivo

Sabendo que ORI 1 se encontra em uma região de DNA repetitivo de 123 bp, fomos investigar se TbOrc1/Cdc6 é capaz de se ligar a esta sequência por meio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) utilizando o anticorpo anti-TbOrc1/Cdc6, disponível em nosso laboratório. Formas procíclicas em cultura de crescimento exponencial foram fixadas com paraformaldeído seguida de sonicação a fim de gerar pequenos fragmentos de DNA contendo proteínas. Estes conjugados de DNA-proteína foram incubados com anti-TbOrc1/Cdc6 e soro normal como controle, seguida de imunoprecipitação com resina G sepharose. Após desconjugar as proteínas do DNA e digerí-las com proteinase K, o DNA foi purificado e gotejado sobre membrana de nylon. Como controle de *input* foi feita a purificação do DNA logo após a sonicação, utilizando 10% do total de cromatina sonicada, que foi também gotejado em membrana de nylon. Após *cross-link* do DNA com a membrana, esta foi incubada com sondas para ORI 1 e sonda para uma região não relacionada a origem de replicação no cromossomo 4 (5[°] CTT GGC TCG CGT GAG TGG AAG G 3[°]).

A figura 4.17 mostra as sondas que reconhecem o DNA do *input* utilizado nas imunoprecipitações com soro normal e anti-TbOrc1/Cdc6, a ausência de sinal na imunoprecipitação com soro normal, e a presença de marcação apenas na hibridização com a sonda ORI 1 no imunoprecipitado com anti-TbOrc1/Cdc6. Assim TbOrc1/Cdc6 interage especificamente com a sequência de ORI 1 *in vivo*.

Figura 4.17- TbOrc1/Cdc6 interage com ORI 1.



Cultura exponencial de formas procíclicas de *T. brucei* foram fixadas com paraformaldeído e a cromatina foi sonicada a fim de gerar pequenos fragmentos de DNA. 10% deste material foi separado, purificado e gotejado em membrana de nylon como controle de *input*. Os 90% restante foram imunoprecipitados com anti-TbOrc1/Cdc6 ou com soro normal como controle. DNA-proteína imunoprecipitados foram purificados, tratados com protease e o DNA resultante foi gotejado em membrana de nylon para finalmente ser hibridizado com sondas de DNA para ORI 1 (repetição de 123 bp) ou com uma sequência não relacionada como controle negativo.

4.2.6 Região do centrômero replica antes de ORI 1

Em *S. cereviseae* sabe-se que a região do centrômero é replicada no começo de S e as regiões próximas ao telômero são duplicadas mais tardiamente em S (60). Em *T. brucei* também determinou-se que a região do centrômero replica-se no início da fase S (100) Sendo ORI 1 uma região de sequência conhecida e repetitiva distante cerca de 300 kb do centrômero (cerca de 1/3 do cromossomo I como indicado na figua 4.18) fomos analisar, por meio de FISH de cultura das formas procíclicas em crescimento exponencial, se *T. brucei* apresenta uma preferência de duplicação destas sequências de DNA no decorrer de S, ou se a replicação neste organismo ocorre sempre no início de S, não apresentando genes preferencialmente replicados no começo ou final de S.

Figura 4.18- ORI 1 e centrômero no cromossomo I de T. brucei.



Representação da disposição de ORI 1 (em vermelho) e do centrômero (em verde) ao longo do cromossomo I de *T. brucei*. Também esta demonstrado o fragmento de 347 kb originário da digestão do cromossomo I com *Asc* I. As sondas de 10 kb também estão ilustradas (em azul).

A figura 4.19 A mostra os diferentes padrões das marcações de ORI 1 e centrômero encontrados em células nas fases G1 e S (que possuem 1 núcleo (N) e 1 cinetoplasto [K]) e G2 (1N2K). Como pode ser visto no gráfico da quantificação destes padrões na figura 4.19 B, são encontradas células com duas marcações para ORI 1 e duas marcações para o centrômero (Figura 4.19 A [a]), além de células que já replicaram todo seu material genético e apresentam 4 marcações para ORI 1 e 4 para o centrômero (Figura 4.19 A [c]). Também foi encontrado o padrão de 2 marcações para ORI 1 e 3 ou 4 marcações para o centrômero (Figura 4.19 A [b]), o padrão contrário de mais marcações para ORI 1 que para centrômero foi encontrada

em apenas 3% das células. Desta forma fica evidente que a região do centrômero replica antes que a região de ORI 1.



(b)

3/4

centromere 2 Ori 1 (123 bp) 2

2 3/4

2 3/4 3/4

(c)

Figura 4.19- Região centromérica replica primeiro que ORI 1.



4.2.7 ORI 1 é uma origem de replicação late

Se ORI 1 replica em um momento após a replicação da região centromérica, seria esta uma origem de replicação *late* em *T. brucei* ? Para responder esta questão, células de cultura exponencial foram tratadas por 12 horas com hidroxiuréia, para sua sincronização, e em seguida lavadas e mantidas em cultura por 1h e 3h. A figura 4.20 A mostra a leitura da intensidade de fluorescência de iodeto de propídeo, que indica a quantidade de DNA, podendo determinar em qual fase do ciclo celular cada ponto de sincronização está em relação a uma cultura não sincronizada (-). Portanto células em meio de S (0h), final de S (1h) e G2 (3h) foram obtidas e o seu DNA foi então purificado e usado para quantificação por *real time* PCR.

A figura 4.20 B esquematiza as regiões que foram amplificadas utilizando par de *primers* específicos (média de 80 bp cada região) e quantificadas. Em 4.20 C estão as quantificações obtidas em meio de S, final de S e G2, na qual a quantificação de G2 foi utilizada para normalizar os resultados. Células em meio de S já apresentam regiões de DNA duplicado (2C), como é o caso do centrômero (barra verde), e também sequências em início de duplicação (barras pouco acima de C) como as regiões 5' (barra vermelha) e 3' (barra rosa) de ORI 1. Os asteriscos indicam que a diferença de quantidade de DNA entre a região do centrômero e ORI 1 (regiões 5'e 3') é significativa com p < 0,01. Ainda é possível observar outra provável origem de replicação em torno da região 550 kb do cromossomo I (barra amarela), que replica no começo de S, mas que nunca foi identificada nos ensaios de SMARD.

Já as células em final de S e G2 apresentam todas as sequências analisadas duplicadas. Portanto ORI 1 é uma origem de replicação *late*, enquanto origens na região centromérica são origens *early*.



Figura 4.20- ORI 1 é uma origem de replicação late.

As formas procíclicas de *T. brucei* foram sincronizadas com hidroxiuréia ou mantidas em cultura como controle (-). Após 12h de tratamento, as células foram lavadas e mantidas em meio de cultura por 1h e 3h. (A) Células sincronizadas foram fixadas e marcadas com iodeto de propídeo e a intensidade de fluorescência foi analisada por citometria de fluxo para determinar a fase do ciclo celular de cada ponto. (C) O DNA das células em meio de S, final de S e G2 foi extraído e quantificado por *real time* PCR (normalizado por regiões do DNA do cinetoplasto) utilizando *primers* (tabela 3.6) para amplificar as regiões do cromossomo I indicado em (B) preto 379255-397274 bp, vermelho 440206-440506 bp, rosa 463829-463914 bp, laranja 504971-505052 bp, amarelo 549145-549225 bp, azul 664782-664857 bp e verde 797547-797625. **p<0,01.

4.2.8 A velocidade da forquilha de replicação nas diferentes formas de vida de T. brucei é similar

Tendo já padronizada a técnica de SMARD, utilizamos esta técnica para calcular a velocidade da forquilha de replicação nas formas procíclicas e sanguículas de *T. brucei*. A estimativa da velocidade da forquilha de replicação do genoma é feita utilizando moléculas de mesmo tamanho em que os análogos de timidina foram incorporados, mas sem a necessidade de hibridização de sondas, seguindo a fórmula na figura 4.21 E.

Desta forma tanto as formas procíclicas quanto as formas sanguículas de *T. brucei* em cultura de crescimento exponencial foram incubadas por 40 minutos com cada análogo de timidina (Idu e CldU, respectivamente). O DNA foi digerido com a enzima *Asc* I e os fragmentos separados em PFGE, como mostra a figura 4.7 A para a forma procíclica e a figura 4.21 C para a forma sanguícula. Os fragmentos da região delimitada pelo retângulo amarelo nos dois PFGE foram esticados em lâminas pré-tratadas com aminosilane e os análogos de timidina foram então detectados (onde IdU é marcado em vermelho e CldU em verde), assim como a integridade da molécula de DNA utilizando anticorpos anti-DNA.

As moléculas da forma procíclica obtidas apresentaram comprimento médio de 145 kb (figura 4.21 B), enquanto que as moléculas da forma sanguícula tiveram comprimento médio de 157 kb (figura 4.21 C). O tamanho médio das moléculas obtidas foi menor que o indicado pelo marcador do PFGE, que indica uma região de cerca de 300 kb, e isso se deve ao fato que as moléculas tendem a quebrar no momento que são esticadas sobre a lâmina. Para isso calculamos o tamanho de cada molécula utilizando a proporção de 61,54 pixels/kb, obtido a partir da distância entre as sondas meio e 3 do fragmento de 347 kb de imagens adquiridas no mesmo microscópio com os mesmos parâmetros de resolução.

As moléculas de DNA obtidas foram utilizadas no cálculo do tempo de duplicação conforme a fórmula na figura 4.21 E, onde: Td é o tempo de duplicação; Tp é o tempo de pulso de cada análogo (que foi de 40 minutos para ambas as formas); NR é o número de moléculas com apenas marcação vermelha e NRG é o número de moléculas com marcação verde e vermelha. A tabela da figura 4.21 E mostra a quantidade das diferentes moléculas obtidas das formas procíclicas e sanguículas, assim como o tempo de duplicação que foi de 22,22 minutos para a forma procíclica e 23,08 minutos para a forma sanguícula. Sabendo o comprimento médio destes fragmentos, foi possível inferir a velocidade da forquilha de replicação apenas dividindo o comprimento médio das moléculas pelo tempo de duplicação, chegando assim a valores similares entre as diferentes formas que foi de 6,53 kb/min e 6,78 kb/min para a forma procíclica e sanguícula, respectivamente.



Figura 4.21- Cálculo da velocidade de replicação das formas procíclicas e sanguículas de *T. brucei*.

O DNA genômico das formas procíclicas e sanguículas, previamente incorporados com IdU e CldU e digerido com a enzima de restrição Asc I, foi submetido a PFGE no equipamento CHEF Mapper (BioRad) conforme os seguintes parâmetros: programa two-state, 120° included angle, 6v/cm, pulso inicial de 18s, pulso final de 33s, corrida de 30h em TAE 0,5X com rampa linear. Em (A) gel de agarose 0,8% para gDNA da forma procíclica e (C) gel de agarose de 1% para gDNA da forma sanguícula. Em (A) e (C) ambos: o retângulo amarelo indica a região de onde foi recuperado o DNA para esticar nas lâminas; P- padrão de corrida para PFGE Lambda Ladder PFGE marker (NEB); 1-DNA correspondente a um plug; 2-DNA que restou das bordas de 4 plugs cuja região central foi cortada e armazenada antes da coloração do brometo de etídeo, para recuperação dos fragmentos de DNA desejados. Em (B) moléculas obtidas da forma sanguícula com comprimento médio de 145 kb e (D) moléculas obtidas da forma sanguícula com comprimento médio de 157 kb. Em (B) e (D) IdU em vermelho, CldU em verde e anti-DNA em branco, a barra branca indica 20kb. (E)

fórmula para obtenção do tempo de duplicação, onde: Td é o tempo de duplicação, Tp é o tempo do pulso de cada análogo, NR é o número de moléculas com apenas marcação vermelha e NRG é o número de moléculas com marcação verde e vermelha. A tabela mostra cada parâmetro utilizado no cálculo do tempo de duplicação para as moléculas obtidas das formas procíclicas e sanguículas, assim como o comprimento médio das moléculas e a velocidade estimada da forquilha de replicação. O tempo de pulso para ambos foi de 40 minutos.

5 DISCUSSÃO

5.1 Controle da replicação do DNA em T. cruzi

A duplicação do DNA deve acontecer apenas uma única vez durante um ciclo celular. Para tanto as células desenvolveram o mecanismo de primeiramente licenciar as origem de replicação para posteriormente ativá-las (115). Desta maneira as origens são licenciadas pelo complexo de pré-replicação (CPR) na transição das fases M/G1, guando a atividade das ciclinas-CDks é baixa. Estes complexos podem ser formados apenas neste momento sendo ativados no início da fase S, quando há alta atividade das ciclinas-CDKs que impede a formação de novos CPR (34). Além disso, origens já disparadas devem ser inativadas para que não sejam novamente disparadas na mesma fase S. Portanto após o início da replicação as proteínas do CPR de origens ativadas devem ser dissociadas (32). Em S. cerevisea ocorre a fosforilação de algumas subunidades de ORC, enquanto Cdc6 é exportada do núcleo e degradada, Cdt1 e MCMs também são exportadas (34). Em humanos, durante a fase S, Orc1é exportada do núcleo e degradada, Cdc6 da mesma maneira é exportada e degradada e Cdt1 é sequestrada por geminina. Juntos, estes processos impedem o recrutamento das MCMs em origens que já foram disparadas (116).

Em trypanosomas ainda não foi estabelecido como ocorre o controle da replicação durante o ciclo celular. Não se sabe, assim, qual o papel do CPR neste controle. Os dados publicados levam a conclusão de que nenhuma das proteínas do CPR participam deste controle, uma vez que Orc1/Cdc6 está sempre no núcleo, ligada ao DNA em *T. brucei* e *T. cruzi* (86), e as MCMs estão sempre expressas e no espaço nuclear em todas as fases do ciclo celular em *T. brucei* (87). Da mesma forma em *T. cruzi* vimos que TcMcm7 está expressa em todas as fases do ciclo celular (figura 4.2 B) permanecendo ligada ao DNA, assim como TcOrc1/Cdc6 (figura 4.3 B). O complexo MCM2-7 é formado antes do seu recrutamento para a cromatina (117, 118). Desta forma TcMcm7 serve como marcador deste complexo e nos mostra que mesmo havendo TcOrc1/Cdc6 e TcMCM ligada ao DNA durante todo o ciclo celular, a replicação do DNA se restringe à fase S, quando há aumento

de PCNA ligado à cromatina (90). Portanto assim como ocorre em T. brucei, o controle em T. cruzi concentra-se em Cdc45, que é exportada do núcleo após a duplicação do DNA (87). Assim é possível que ainda que TcMCM esteja ligada ao DNA em todas as fases do ciclo, a sua atividade de helicase só exista na presença de Cdc45 e GINS. Neste contexto, Cdc45 estaria sob a regulação das CRKs e CYC, assim como está sob a regulação de cilinas-CDKs em outros organismos (2, 32) ativando a atividade de helicase apenas na fase S, sendo exportada do núcleo em M voltando para o espaço nuclear quando a célula entra novamente em G1 (figura 5.1 A) (87). É possível ainda que Cdc45 esteja expressa em baixos níveis, sendo assim um fator limitante (119). Neste caso, Cdc45 seria capaz de interagir, durante a fase S, apenas com algumas origens de replicação que devem ser ativadas. Em caso de colapso irreversível de uma forquilha em andamento, Cdc45 ficaria então disponível para ativar uma origem dormente. Uma vez que MCM2-7 se move com a forquilha de replicação (120), origens dormentes ainda possuem MCM2-7 que podem ser ativadas por Cdc45, diferente das origens que foram disparadas cuja MCM2-7 foi deslocada não podendo ser novamente ativa.

De maneira diferente do que acontece durante o ciclo celular, as proteínas do CPR apresentam função de controle da replicação durante o ciclo de vida de *T. cruzi*.

No decorrer dos estágios de vida de *T. cruzi* no vetor invertebrado e no hospedeiro mamífero, este parasita apresenta diferentes formas que são capazes de replicar, porém não infectam (amastigota em mamíferos e epimastigota no vetor) e outras que não replicam, mas infectam (tripomastigota em mamíferos e tripomastigota metacíclico no vetor). Ao analisarmos a expressão da proteína TcPCNA, típico marcador de maquinaria de replicação (121-123), nestes quatro estágios vimos que está sempre expressa, mesmo nas formas não replicativas (figura 4.4 D). Contudo sua interação com o DNA se restringe apenas às formas celulares que replicam (fig 4.5).

Ao nos voltarmos para as proteínas do CPR que são essenciais no processo de acesso do TcPCNA ao DNA, pudemos obervar que enquanto TcOrc1/Cdc6 é expressa e se localiza no núcleo tanto nas formas replicativas (86) quanto nas não replicativas (figura 4.4 C), TcMcm7 se encontra expressa (figura 4.4 D) e ligada ao DNA somente nas formas replicativas (figura 4.5 A e B). Além disso, TcOrc1/Cdc6 expressa nas formas replicativas interage com o DNA (figura 4.5 A e B), mas não

nas formas não replicativas (figura 4.5 C e D). Isso nos leva a concluir que no ciclo de vida o controle da replicação ocorre com mecanismos muito mais drásticos do que aqueles observados no seu ciclo celular, já que TcOrc1/Cdc6 não apresenta interação com o DNA com o adicional da ausência de expressão de TcMcm7 (figura 5.1 B).

A ausência de TcMcm7 e a perda de afinidade de TcOrc1/Cdc6 com a cromatina nas formas não replicativas nos leva crer que as formas tripomastigostas se comportam como células quiescentes..

Em células de mamíferos que progridem para G0 as proteínas do CPR perdem afinidade pela cromatina (124) e em diversos tipos celulares as proteínas MCM2-7 não apenas se desligam da cromatina, mas são degradadas em células quiescentes e também em células senescentes (125). Contudo ORC permanece no núcleo mesmo em células senescentes, muito provavelmente devido ao seu papel em outras funções, como no silenciamento transcricional (126). Portanto acredita-se que os mecanismos que regulam o licenciamento das origens das células que saem de G0 e retornam para o ciclo celular sejam diferentes daqueles de células que já estejam ciclando (127).

Controle parecido com o acima descrito parece ocorrer durante a passagem das formas replicativas para as não replicativas em *T. cruzi*, no qual há perda da afinidade de TcOrc1/Cdc6 pela cromatina além da degradação de TcMcm7. Modificações pós-traducionais em TcOrc1/Cdc6 podem causar o seu desligamento do DNA, por mecanismos ainda a serem descobertos. Esta ligação pode ser retomada durante o processo de transformação de célula não-replicativa para replicativa, onde a afinidade de TcOrc1/Cdc6 pela cromatina é reestabelecida e TcMcm7 é novamente expressa.

Ainda também existem os fatores estruturais da cromatina nas diferentes formas de vida de *T. cruzi*, cujas formas replicativas apresentam alta atividade transcricional e cromatina mais frouxa (128), enquanto formas não replicativas apresentam baixa atividade transcricional e cromatina mais densa (128, 129). Desta maneira durante a passagem de tripomastigota para epimastigota e também durante a passagem de tripomastigota, há aumento da atividade transcricional onde pode ocorrer novamente síntese de TcMcm7 através da tradução das novas moléculas de mRNA.

Além disso, as origens de replicação têm sido correlacionadas com regiões de cromatina mais acessível, que ocorre em locais de maior atividade transcricional (36). Em T. brucei os sítios de ligação de Orc1/Cdc6, as origens de replicação, tem alta coincidência com os sítios de início de transcrição onde a cromatina é mais aberta (100). Assim conforme aumenta a atividade transcricional nas formas replicativas, TcOrc1/Cdc6 ganha acesso ao DNA, recrutando assim TcMcm7 recémsintetizada para que estas células possam licenciar as origens e retomar o processo de replicação.

Figura 5.1 – Controle da replicação em trypanosomas



Controle da Replicação no Ciclo Celular de Epimastigota

(A) As proteínas do complexo de pré-replicação TcOrc1/Cdc6 e TcMCM2-7 permanecem ligadas ao DNA em G1, porém são ativadas apenas em S quando a atividade de helicase do complexo Cdc45 · MCM2-7 · GINS (CMG) permite a abertura da dupla fita de DNA, se movendo juntamente com a forquilha de replicação. Em G2 a Cdc45 permanece no núcleo, porém as origens já disparadas não são mais ativadas uma vez que as MCM foram deslocadas junto com a forquilha de replicação. Em M Cdc45 é exportada do núcleo. (B) Enquanto nas formas replicativas TcOrc1/Cdc6 e TcMCM2-7 permanecem ligadas ao DNA, nas formas não replicativas Orc1/Cdc6 permanece no núcleo, mas desligadas do DNA e TcMCM2-7 está ausente.

5.2 Dinâmica das forquilhas de replicação em T. brucei

A técnica de SMARD é uma ferramenta valiosa para os estudos da replicação do DNA, pois permite avaliar o perfil da replicação a partir de moléculas individuais, fornecendo dados detalhados. A padronização desta técnica trouxe ao nosso laboratório a possibilidade de realizar análises que antes não seriam possíveis.

Ainda que não foi possível analisar todo o cromossomo I da forma procíclica de *T. brucei*, pudemos avaliar o perfil de replicação da região central deste cromossomo, além de estimar a velocidade da forquilha nesse parasita nas formas procíclicas e sanguículas.

As moléculas analisadas referente ao fragmento central de 347 kb do cromossomo I (figura 4.16 B), evidenciaram a existência de uma origem de replicação (ORI 1) nova ainda não descrita, cuja sequência é capaz de ser reconhecida *in vivo* por TbOrc1/Cdc6 (figura 4.17) e que se comporta como uma origem de replicação *late* (figura 4.20).

As forquilhas de replicação a partir de ORI 1, juntamente com outras duas forquilhas proveniente de origens nas regiões 5` e 3` adjacentes são responsáveis pela duplicação desse fragmento (figuras 4.16 A-F). Ainda é possível observar que ocorrem diferentes combinações da progressão das forquilhas, sendo que em algumas moléculas nem todas as forquilhas estão envolvidas no processo de replicação (figura 4.16 G), havendo inclusive moléculas onde ORI 1 não foi disparada (figura 4.16 F).

Também verificamos que a velocidade da forquilha de replicação é muito similar entre as formas procíclicas e sanguículas de *T. brucei*, sendo de 6,53 kb/min e 6,78 kb/min, respectivamente(figura 4.21). Essa velocidade é um pouco maior que a encontrada em leveduras (2 kb/min) (16) e humanos (2 a 3 kb/min)(15), o que pode ser explicado pela transcrição policistrônica nestes parasitas, havendo assim uma menor chance de empacamento da forquilha de replicação devido ao encontro desta com a maquinaria de transcrição. Em leveduras estima-se que haja empacamento da forquilha de replicação tem sua velocidade diminuída devido aos encontros entre maquinaria de transcrição (100). A taxa de encontro deve ser muito menor em *T. brucei* porque a densidade de

regiões de início de transcrição é menor, uma vez que vários genes são transcritos em sequência(93) e não por meio de regiões promotoras individuais para cada gene, como é o caso das leveduras (131). Cabe dizer que o sítio catalítico das DNA polimerases delta e épsilon têm todos os domínios conservados, de modo que a pequena diferença de velocidade não estaria relacionada com diferenças entre estas polimerases.

A obtenção da velocidade de replicação nos permite estimar quantas origens de replicação ativas há em *T. brucei* (forma procíclica). Sabendo que: (i) o genoma, dos cromossomos da ordem de megabase, é de 26 Mb, (ii) que a média do tempo da fase S é de 90 minutos (84) e (iii) que a velocidade é de 6,53kb/minutos, podemos chegar ao número de aproximadamente 44 origens ativas, que teriam um espaçamento médio de 591 kb. Neste caso, considerando que todas as origens são disparadas no começo de S com velocidade de replicação constante.

Estes dados estão de acordo com (100), que fez o mapeamento das origens disparadas na primeira metade da fase S e encontrou 42 regiões de início de replicação (origens *early*). Porém, como pudemos comprovar aqui, existem origens *late* de forma que o número de origens ativas deve ser maior, tendo sido estimada em aproximadamente 100 origens ativas (1 origem a cada 260 kb)(100) das 170 encontradas no genoma de *T. brucei*.

Esta baixa densidade de origens de replicação, menor que leveduras (1 origem a cada 46 kb (132) e humanos (1 a cada 100 kb), corrobora para o fato da forquilha de replicação em *T. brucei* apresentar velocidade um pouco maior que nestes organismos citados, justamente pela diminuição dos encontros entre a replicação e transcrição.

Considerando este cenário de poucas origens ativas e empacamento de forquilhas de replicação no encontro com a transcrição (133), podemos explicar porque ORI 1 é uma origem *late* que por vezes não é disparada (figura 5.2). Com média de uma origem para cada 260 kb, o cromossomo I teoricamente necessita de 4 origens de replicação disparadas durante a fase S para que possa ser totalmente replicado. Quando as origens nas regiões adjacentes ao fragmento de 347 kb (ORIs 3` e ORIs 5`) são disparadas e tem condições ideais de progressão, não havendo empacamento de forquilhas, ORI 1 não é disparada sendo replicada passivamente (figura 4.16 F). As origens na região 5` (setas em cinza), provavelmente são origens

late uma vez que as origens *early* já identificadas estão na região do centrômero (100).

Porém quando há o empacamento da forquilha vinda das ORIs 3` (origens *early*) devido ao seu encontro com a transcrição, ocorre a ativação de ORI 1. Ou ainda se as origens ORIs 5` empacarem ou forem disparadas mais tardiamente em S, ocorrerá o disparo de ORI 1.



Figura 5.2 – Perfil da replicação no cromossomo I de T. brucei

Representação esquemática do cromossomo I de *T. brucei* quanto aos sítios de ligação de TbOrc1/Cdc6, origens de replicação, lisinas 10 acetilada de histona H4 (H4K10ac) e unidades policistrônicas. No painel superior as barras laranja indicam os sítios de ligação de TbOrc1/Cdc6. As setas indicam as origens de replicação ORI 1 (em vermelho – origem *late*), origens na região 5` (cinza – provavelmente origens *late*) e 3` (roxo – origens *early*) adjacentes ao fragmento de 347 kb, que é delimitado pelos sítios de restrição *Asc* I (em azul). Os picos de H4K10ac indicam os sítios de início de transcrição e os bloco cinzas representam as unidades de transcrição policistrônica ao longo do cromossomo I, sendo os blocos acima da linha transcritos para a esquerda e os blocos abaixo para a diretira. As setas verdes indicam o sentido da transcrição.

Pelos resultados obtidos, há grande chance das forquilhas das origens *early* empacaram, pois a progressão destas na direção de ORI 1 encontra duas grandes regiões de transcrição que vem em direção oposta. Acrescido ao fato de que foram encontradas apenas algumas moléculas em que a replicação se deu apenas pelas

forquilhas vinda de 5`e 3` (figura 4.16 F) concluímos que o não disparo de ORI 1 deve ser menos frequente.

Finalmente, já foi demonstrado em leveduras que se todas as origens de replicação fossem disparadas ao mesmo tempo durante a fase S, o pool de dNTPS esgotaria-se(134). Antes deste trabalho, não estava claro se um genoma do tamanho do de *T. brucei* também necessitaria de origens disparando em diferentes momntos da fase S. Neste trabalho encontramos mais de uma região que replica tardiamente na fase S (ORI 1 e barra amarela da figura 4.20 C). Assim, uma das possibilidades da presença de origens *early* e *late* em *T. brucei* é que este é um recurso para a célula trabalhar com o pool de dNTPS disponível no meio intracelular.

Essa dinâmica da replicação assim como a existência de mais origens de replicação licenciadas que ativas (100) mostra que em um organismo distante na escala evolutiva já apresenta maneiras de resolver o problema íntrinsico da replicação, como os encontros entre a replicação e a transcrição e o esgotamento de dNTPs, apresentando origens que podem ser disparadas tardiamente quando as condições de replicação não são as ideais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho mostramos que existem dois mecanismos distintos no controle da replicação do DNA em *T. cruzi* em seu ciclo celular e de vida. Durante o ciclo celular as proteínas do complexo de pré-replicação não desempenham função no controle da replicação. Já em seu ciclo de vida a ausência de expressão ou falta de interação com o DNA das proteínas do complexo de pré-replicação impedem que as formas não-replicativas dupliquem seu DNA.

Também, através da técnica de SMARD padronizada neste presente trabalho, encontramos uma nova origem de replicação em *T. brucei* que é uma origem *late*, além de determinarmos a velocidade da forquilha replicação e entendermos a dinâmica da replicação no cromossomo I de *T. brucei*.

REFERÊNCIAS*

1. Diaz-Padilla I, Siu LL, Duran I. Cyclin-dependent kinase inhibitors as potential targeted anticancer agents. Invest New Drugs. 2009;27(6):586-94.

2. Duronio RJ, Xiong Y. Signaling pathways that control cell proliferation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013;5(3):a008904.

3. Morrison DK. MAP kinase pathways. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012;4(11).

4. Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. Genes Dev. 1998;12(15):2245-62.

5. Hwang HC, Clurman BE. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. Oncogene. 2005;24(17):2776-86.

6. Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S, et al. Cyclin E ablation in the mouse. Cell. 2003;114(4):431-43.

7. Hindley C, Philpott A. The cell cycle and pluripotency. Biochem J. 2013;451(2):135-43.

8. Araki H. Cyclin-dependent kinase-dependent initiation of chromosomal DNA replication. Curr Opin Cell Biol. 2010;22(6):766-71.

9. Hwang DS, Kornberg A. Opening of the replication origin of Escherichia coli by DnaA protein with protein HU or IHF. J Biol Chem. 1992;267(32):23083-6.

10. Theis JF, Newlon CS. The ARS309 chromosomal replicator of Saccharomyces cerevisiae depends on an exceptional ARS consensus sequence. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(20):10786-91.

11. Evertts AG, Coller HA. Back to the origin: reconsidering replication, transcription, epigenetics, and cell cycle control. Genes Cancer. 2012;3(11-12):678-96.

12. Nishigaki K, Saito A, Takashi H, Naimuddin M. Whole genome sequenceenabled prediction of sequences performed for random PCR products of Escherichia coli. Nucleic Acids Res. 2000;28(9):1879-84.

13. Cassler MR, Grimwade JE, Leonard AC. Cell cycle-specific changes in nucleoprotein complexes at a chromosomal replication origin. EMBO J. 1995;14(23):5833-41.

De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org.

14. Kaguni JM. DnaA: controlling the initiation of bacterial DNA replication and more. Annu Rev Microbiol. 2006;60:351-75.

15. Méchali M. Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010;11(10):728-38.

16. Hodgson B, Calzada A, Labib K. Mrc1 and Tof1 regulate DNA replication forks in different ways during normal S phase. Mol Biol Cell. 2007;18(10):3894-902.

17. Bell SP, Stillman B. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. Nature. 1992;357(6374):128-34.

18. Marahrens Y, Stillman B. A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. Science. 1992;255(5046):817-23.

19. Okuno Y, Satoh H, Sekiguchi M, Masukata H. Clustered adenine/thymine stretches are essential for function of a fission yeast replication origin. Mol Cell Biol. 1999;19(10):6699-709.

20. Bryant JA, Aves SJ. Initiation of DNA replication: functional and evolutionary aspects. Ann Bot. 2011;107(7):1119-26.

21. Bell SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. Annu Rev Biochem. 2002;71:333-74.

22. Yanagi K, Mizuno T, You Z, Hanaoka F. Mouse geminin inhibits not only Cdt1-MCM6 interactions but also a novel intrinsic Cdt1 DNA binding activity. J Biol Chem. 2002;277(43):40871-80.

23. Maiorano D, Lutzmann M, Méchali M. MCM proteins and DNA replication. Curr Opin Cell Biol. 2006;18(2):130-6.

24. Aparicio OM, Weinstein DM, Bell SP. Components and dynamics of DNA replication complexes in S. cerevisiae: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase. Cell. 1997;91(1):59-69.

25. Labib K, Tercero JA, Diffley JF. Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. Science. 2000;288(5471):1643-7.

26. Tanaka S, Diffley JF. Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase. Nat Cell Biol. 2002;4(3):198-207.

27. Stillman B. Origin recognition and the chromosome cycle. FEBS Lett. 2005;579(4):877-84.

28. Robinson NP, Bell SD. Origins of DNA replication in the three domains of life. FEBS J. 2005;272(15):3757-66.

29. Lundgren M, Bernander R. Archaeal cell cycle progress. Curr Opin Microbiol. 2005;8(6):662-8.

30. Liu Y, Richards TA, Aves SJ. Ancient diversification of eukaryotic MCM DNA replication proteins. BMC Evol Biol. 2009;9:60.

31. Im JS, Ki SH, Farina A, Jung DS, Hurwitz J, Lee JK. Assembly of the Cdc45-Mcm2-7-GINS complex in human cells requires the Ctf4/And-1, RecQL4, and Mcm10 proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(37):15628-32.

32. Takeda DY, Dutta A. DNA replication and progression through S phase. Oncogene. 2005;24(17):2827-43.

33. Garg P, Burgers PM. DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2005;40(2):115-28.

34. Nguyen VQ, Co C, Li JJ. Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. Nature. 2001;411(6841):1068-73.

35. Truong LN, Wu X. Prevention of DNA re-replication in eukaryotic cells. J Mol Cell Biol. 2011;3(1):13-22.

36. Sequeira-Mendes J, Díaz-Uriarte R, Apedaile A, Huntley D, Brockdorff N, Gómez M. Transcription initiation activity sets replication origin efficiency in mammalian cells. PLoS Genet. 2009;5(4):e1000446.

37. Gilbert DM. Replication timing and metazoan evolution. Nat Genet. 2002;32(3):336-7.

38. Luger K, Dechassa ML, Tremethick DJ. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? Nat Rev Mol Cell Biol. 2012;13(7):436-47.

39. Joti Y, Hikima T, Nishino Y, Kamada F, Hihara S, Takata H, et al. Chromosomes without a 30-nm chromatin fiber. Nucleus. 2012;3(5):404-10.

40. Nishino Y, Eltsov M, Joti Y, Ito K, Takata H, Takahashi Y, et al. Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. EMBO J. 2012;31(7):1644-53.

41. Maeshima K, Hihara S, Eltsov M. Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? Curr Opin Cell Biol. 2010;22(3):291-7.

42. Caterino TL, Hayes JJ. Structure of the H1 C-terminal domain and function in chromatin condensation. Biochem Cell Biol. 2011;89(1):35-44.

43. Woodcock CL, Ghosh RP. Chromatin higher-order structure and dynamics. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2(5):a000596.

44. Friedman KL, Brewer BJ, Fangman WL. Replication profile of Saccharomyces cerevisiae chromosome VI. Genes Cells. 1997;2(11):667-78.

45. Heichinger C, Penkett CJ, Bähler J, Nurse P. Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins. EMBO J. 2006;25(21):5171-9.

46. Lebofsky R, Heilig R, Sonnleitner M, Weissenbach J, Bensimon A. DNA replication origin interference increases the spacing between initiation events in human cells. Mol Biol Cell. 2006;17(12):5337-45.

47. Hamlin JL, Mesner LD, Lar O, Torres R, Chodaparambil SV, Wang L. A revisionist replicon model for higher eukaryotic genomes. J Cell Biochem. 2008;105(2):321-9.

48. Gilbert DM. Replication timing and transcriptional control: beyond cause and effect. Curr Opin Cell Biol. 2002;14(3):377-83.

49. DePamphilis ML. Eukaryotic DNA replication: anatomy of an origin. Annu Rev Biochem. 1993;62:29-63.

50. Kohzaki H, Murakami Y. Transcription factors and DNA replication origin selection. Bioessays. 2005;27(11):1107-16.

51. Ardell DH, Kirsebom LA. The genomic pattern of tDNA operon expression in E. coli. PLoS Comput Biol. 2005;1(1):e12.

52. Couturier E, Rocha EP. Replication-associated gene dosage effects shape the genomes of fast-growing bacteria but only for transcription and translation genes. Mol Microbiol. 2006;59(5):1506-18.

53. Cohen SM, Brylawski BP, Cordeiro-Stone M, Kaufman DG. Same origins of DNA replication function on the active and inactive human X chromosomes. J Cell Biochem. 2003;88(5):923-31.

54. Forrester WC, Epner E, Driscoll MC, Enver T, Brice M, Papayannopoulou T, et al. A deletion of the human beta-globin locus activation region causes a major alteration in chromatin structure and replication across the entire beta-globin locus. Genes Dev. 1990;4(10):1637-49.

55. Rizzardi LF, Dorn ES, Strahl BD, Cook JG. DNA replication origin function is promoted by H3K4 di-methylation in Saccharomyces cerevisiae. Genetics. 2012;192(2):371-84.

56. Gómez M, Brockdorff N. Heterochromatin on the inactive X chromosome delays replication timing without affecting origin usage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(18):6923-8.

57. Bosco G, Du W, Orr-Weaver TL. DNA replication control through interaction of E2F-RB and the origin recognition complex. Nat Cell Biol. 2001;3(3):289-95.

58. Ito K, Asano M, Hughes P, Kohzaki H, Masutani C, Hanaoka F, et al. c-Jun stimulates origin-dependent DNA unwinding by polyomavirus large Tantigen. EMBO J. 1996;15(20):5636-46.

59. Rhind N. DNA replication timing: random thoughts about origin firing. Nat Cell Biol. 2006;8(12):1313-6.

60. Aparicio OM. Location, location, location: it's all in the timing for replication origins. Genes Dev. 2013;27(2):117-28.

61. Aparicio OM, Stout AM, Bell SP. Differential assembly of Cdc45p and DNA polymerases at early and late origins of DNA replication. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(16):9130-5.

62. Knott SR, Peace JM, Ostrow AZ, Gan Y, Rex AE, Viggiani CJ, et al. Forkhead transcription factors establish origin timing and long-range clustering in S. cerevisiae. Cell. 2012;148(1-2):99-111.

63. Hayano M, Kanoh Y, Matsumoto S, Renard-Guillet C, Shirahige K, Masai H. Rif1 is a global regulator of timing of replication origin firing in fission yeast. Genes Dev. 2012;26(2):137-50.

64. Tazumi A, Fukuura M, Nakato R, Kishimoto A, Takenaka T, Ogawa S, et al. Telomere-binding protein Taz1 controls global replication timing through its localization near late replication origins in fission yeast. Genes Dev. 2012;26(18):2050-62.

65. Blow JJ, Ge XQ, Jackson DA. How dormant origins promote complete genome replication. Trends Biochem Sci. 2011;36(8):405-14.

66. McIntosh D, Blow JJ. Dormant origins, the licensing checkpoint, and the response to replicative stresses. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012;4(10).

67. Borowiec JA, Schildkraut CL. Open sesame: activating dormant replication origins in the mouse immunoglobulin heavy chain (Igh) locus. Curr Opin Cell Biol. 2011;23(3):284-92.

68. Gilbert DM. Replication origin plasticity, Taylor-made: inhibition vs recruitment of origins under conditions of replication stress. Chromosoma. 2007;116(4):341-7.

69. Karnani N, Dutta A. The effect of the intra-S-phase checkpoint on origins of replication in human cells. Genes Dev. 2011;25(6):621-33.

70. Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104 Suppl 1:31-40.

71. Brun R, Blum J, Chappuis F, Burri C. Human African trypanosomiasis. Lancet. 2010;375(9709):148-59.

72. Lee SH, Stephens JL, Englund PT. A fatty-acid synthesis mechanism specialized for parasitism. Nat Rev Microbiol. 2007;5(4):287-97.

73. Naula C, Parsons M, Mottram JC. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and Leishmania. Biochim Biophys Acta. 2005;1754(1-2):151-9.

74. Potenza M, Schenkman S, Laverrière M, Tellez-Iñón MT. Functional characterization of TcCYC2 cyclin from Trypanosoma cruzi. Exp Parasitol. 2012;132(4):537-45.

75. Santori MI, Laría S, Gómez EB, Espinosa I, Galanti N, Téllez-Iñón MT. Evidence for CRK3 participation in the cell division cycle of Trypanosoma cruzi. Mol Biochem Parasitol. 2002;121(2):225-32.

76. Gourguechon S, Savich JM, Wang CC. The multiple roles of cyclin E1 in controlling cell cycle progression and cellular morphology of Trypanosoma brucei. J Mol Biol. 2007;368(4):939-50.

77. Hammarton TC, Engstler M, Mottram JC. The Trypanosoma brucei cyclin, CYC2, is required for cell cycle progression through G1 phase and for maintenance of procyclic form cell morphology. J Biol Chem. 2004;279(23):24757-64.

78. Li Z, Wang CC. A PHO80-like cyclin and a B-type cyclin control the cell cycle of the procyclic form of Trypanosoma brucei. J Biol Chem. 2003;278(23):20652-8.

79. Tu X, Wang CC. The involvement of two cdc2-related kinases (CRKs) in Trypanosoma brucei cell cycle regulation and the distinctive stage-specific phenotypes caused by CRK3 depletion. J Biol Chem. 2004;279(19):20519-28.

80. Tu X, Wang CC. Pairwise knockdowns of cdc2-related kinases (CRKs) in Trypanosoma brucei identified the CRKs for G1/S and G2/M transitions and demonstrated distinctive cytokinetic regulations between two developmental stages of the organism. Eukaryot Cell. 2005;4(4):755-64.

 Bourguechon S, Wang CC. CRK9 contributes to regulation of mitosis and cytokinesis in the procyclic form of Trypanosoma brucei. BMC Cell Biol. 2009;10:68.
Hammarton TC, Clark J, Douglas F, Boshart M, Mottram JC. Stage-specific differences in cell cycle control in Trypanosoma brucei revealed by RNA interference of a mitotic cyclin. J Biol Chem. 2003;278(25):22877-86.

83. Elias MC, da Cunha JP, de Faria FP, Mortara RA, Freymüller E, Schenkman S. Morphological events during the Trypanosoma cruzi cell cycle. Protist. 2007;158(2):147-57.

84. Woodward R, Gull K. Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of Trypanosoma brucei. J Cell Sci. 1990;95 (Pt 1):49-57.

85. McKean PG. Coordination of cell cycle and cytokinesis in Trypanosoma brucei. Curr Opin Microbiol. 2003;6(6):600-7.

86. Godoy PD, Nogueira-Junior LA, Paes LS, Cornejo A, Martins RM, Silber AM, et al. Trypanosome prereplication machinery contains a single functional orc1/cdc6 protein, which is typical of archaea. Eukaryot Cell. 2009;8(10):1592-603.

87. Dang HQ, Li Z. The Cdc45·Mcm2-7·GINS protein complex in trypanosomes regulates DNA replication and interacts with two Orc1-like proteins in the origin recognition complex. J Biol Chem. 2011;286(37):32424-35.

88. Tiengwe C, Marcello L, Farr H, Gadelha C, Burchmore R, Barry JD, et al. Identification of ORC1/CDC6-interacting factors in Trypanosoma brucei reveals critical features of origin recognition complex architecture. PLoS One. 2012;7(3):e32674.

89. Matsunaga F, Forterre P, Ishino Y, Myllykallio H. In vivo interactions of archaeal Cdc6/Orc1 and minichromosome maintenance proteins with the replication origin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(20):11152-7.

90. Calderano SG, de Melo Godoy PD, Motta MC, Mortara RA, Schenkman S, Elias MC. Trypanosoma cruzi DNA replication includes the sequential recruitment of pre-replication and replication machineries close to nuclear periphery. Nucleus. 2011;2(2):136-45.

91. Kaufmann D, Gassen A, Maiser A, Leonhardt H, Janzen CJ. Regulation and spatial organization of PCNA in Trypanosoma brucei. Biochem Biophys Res Commun. 2012;419(4):698-702.

92. Huang J, van der Ploeg LH. Maturation of polycistronic pre-mRNA in Trypanosoma brucei: analysis of trans splicing and poly(A) addition at nascent RNA transcripts from the hsp70 locus. Mol Cell Biol. 1991;11(6):3180-90.

93. Ullu E, Matthews KR, Tschudi C. Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. Mol Cell Biol. 1993;13(1):720-5.

94. Gilinger G, Bellofatto V. Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. Nucleic Acids Res. 2001;29(7):1556-64.

95. El-Sayed NM, Ghedin E, Song J, MacLeod A, Bringaud F, Larkin C, et al. The sequence and analysis of Trypanosoma brucei chromosome II. Nucleic Acids Res. 2003;31(16):4856-63.

 Martínez-Calvillo S, Nguyen D, Stuart K, Myler PJ. Transcription initiation and termination on Leishmania major chromosome 3. Eukaryot Cell. 2004;3(2):506-17.
Siegel TN, Gunasekera K, Cross GA, Ochsenreiter T. Gene expression in Trypanosoma brucei: lessons from high-throughput RNA sequencing. Trends Parasitol. 2011;27(10):434-41. 98. Siegel TN, Hekstra DR, Kemp LE, Figueiredo LM, Lowell JE, Fenyo D, et al. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in Trypanosoma brucei. Genes Dev. 2009;23(9):1063-76.

99. Cliffe LJ, Siegel TN, Marshall M, Cross GA, Sabatini R. Two thymidine hydroxylases differentially regulate the formation of glucosylated DNA at regions flanking polymerase II polycistronic transcription units throughout the genome of Trypanosoma brucei. Nucleic Acids Res. 2010;38(12):3923-35.

100. Tiengwe C, Marcello L, Farr H, Dickens N, Kelly S, Swiderski M, et al. Genome-wide analysis reveals extensive functional interaction between DNA replication initiation and transcription in the genome of Trypanosoma brucei. Cell Rep. 2012;2(1):185-97.

101. de Sousa MA. A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of Trypanosoma cruzi using DEAE-cellulose columns. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1983;78(3):317-33.

102. Chowdhury AR, Zhao Z, Englund PT. Effect of hydroxyurea on procyclic Trypanosoma brucei: an unconventional mechanism for achieving synchronous growth. Eukaryot Cell. 2008;7(2):425-8.

103. Elias MC, Faria M, Mortara RA, Motta MC, de Souza W, Thiry M, et al. Chromosome localization changes in the Trypanosoma cruzi nucleus. Eukaryot Cell. 2002;1(6):944-53.

104. Biozzi G, Mouton D, Sant'Anna OA, Passos HC, Gennari M, Reis MH, et al. Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. Curr Top Microbiol Immunol. 1979;85:31-98.

105. Mercuri LP, Carvalho LV, Lima FA, Quayle C, Fantini MC, Tanaka GS, et al. Ordered mesoporous silica SBA-15: a new effective adjuvant to induce antibody response. Small. 2006;2(2):254-6.

106. PfaffI MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001;29(9):e45.

107. Silber AM, Tonelli RR, Lopes CG, Cunha-e-Silva N, Torrecilhas AC, Schumacher RI, et al. Glucose uptake in the mammalian stages of Trypanosoma cruzi. Mol Biochem Parasitol. 2009;168(1):102-8.

108. Bangs JD, Uyetake L, Brickman MJ, Balber AE, Boothroyd JC. Molecular cloning and cellular localization of a BiP homologue in Trypanosoma brucei. Divergent ER retention signals in a lower eukaryote. J Cell Sci. 1993;105 (Pt 4):1101-13.

109. Chung J, Rocha AA, Tonelli RR, Castilho BA, Schenkman S. Eukaryotic initiation factor 5A dephosphorylation is required for translational arrest in stationary phase cells. Biochem J. 2013;451(2):257-67.

110. da Cunha JP, Nakayasu ES, de Almeida IC, Schenkman S. Post-translational modifications of Trypanosoma cruzi histone H4. Mol Biochem Parasitol. 2006;150(2):268-77.

111. Obado SO, Bot C, Nilsson D, Andersson B, Kelly JM. Repetitive DNA is associated with centromeric domains in Trypanosoma brucei but not Trypanosoma cruzi. Genome Biol. 2007;8(3):R37.

112. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, et al. The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease. Science. 2005;309(5733):409-15.

113. Norio P, Schildkraut CL. Visualization of DNA replication on individual Epstein-Barr virus episomes. Science. 2001;294(5550):2361-4.

114. Drosopoulos WC, Kosiyatrakul ST, Yan Z, Calderano SG, Schildkraut CL. Human telomeres replicate using chromosome-specific, rather than universal, replication programs. J Cell Biol. 2012;197(2):253-66.

115. Lei M, Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. J Cell Sci. 2001;114(Pt 8):1447-54.

116. Blow JJ, Dutta A. Preventing re-replication of chromosomal DNA. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005;6(6):476-86.

117. Remus D, Beuron F, Tolun G, Griffith JD, Morris EP, Diffley JF. Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. Cell. 2009;139(4):719-30.

118. Evrin C, Clarke P, Zech J, Lurz R, Sun J, Uhle S, et al. A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(48):20240-5.

119. Wong PG, Winter SL, Zaika E, Cao TV, Oguz U, Koomen JM, et al. Cdc45 limits replicon usage from a low density of preRCs in mammalian cells. PLoS One. 2011;6(3):e17533.

120. Kamada K. The GINS Complex: Structure and Function. Subcell Biochem. 2012;62:135-56.

121. Cook PR. The organization of replication and transcription. Science. 1999;284(5421):1790-5.

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

123. Postberg J, Alexandrova O, Cremer T, Lipps HJ. Exploiting nuclear duality of ciliates to analyse topological requirements for DNA replication and transcription. J Cell Sci. 2005;118(Pt 17):3973-83.

124. Stoeber K, Tlsty TD, Happerfield L, Thomas GA, Romanov S, Bobrow L, et al. DNA replication licensing and human cell proliferation. J Cell Sci. 2001;114(Pt 11):2027-41.

125. Musahl C, Holthoff HP, Lesch R, Knippers R. Stability of the replicative Mcm3 protein in proliferating and differentiating human cells. Exp Cell Res. 1998;241(1):260-4.

126. Fox CA, Loo S, Dillin A, Rine J. The origin recognition complex has essential functions in transcriptional silencing and chromosomal replication. Genes Dev. 1995;9(8):911-24.

127. Blow JJ, Hodgson B. Replication licensing--defining the proliferative state? Trends Cell Biol. 2002;12(2):72-8.

128. Elias MC, Marques-Porto R, Freymüller E, Schenkman S. Transcription rate modulation through the Trypanosoma cruzi life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. Mol Biochem Parasitol. 2001;112(1):79-90.

129. Ferreira LR, Dossin FeM, Ramos TC, Freymüller E, Schenkman S. Active transcription and ultrastructural changes during Trypanosoma cruzi metacyclogenesis. An Acad Bras Cienc. 2008;80(1):157-66.

130. Maya-Mendoza A, Petermann E, Gillespie DA, Caldecott KW, Jackson DA. Chk1 regulates the density of active replication origins during the vertebrate S phase. EMBO J. 2007;26(11):2719-31.

131. Hawkins PG, Morris KV. RNA and transcriptional modulation of gene expression. Cell Cycle. 2008;7(5):602-7.

132. Yabuki N, Terashima H, Kitada K. Mapping of early firing origins on a replication profile of budding yeast. Genes Cells. 2002;7(8):781-9.

133. Masai H, Tanaka T, Kohda D. Stalled replication forks: making ends meet for recognition and stabilization. Bioessays. 2010;32(8):687-97.

134. Mantiero D, Mackenzie A, Donaldson A, Zegerman P. Limiting replication initiation factors execute the temporal programme of origin firing in budding yeast. EMBO J. 2011;30(23):4805-14.