UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

DAIANE DA ROCHA SOARES

Modulação de Orc1/Cdc6 de *Trypanosoma brucei* pela ligação e hidrólise de ATP

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

São Paulo
2014

DAIANE DA ROCHA SOARES

Modulação de Orc1/Cdc6 de *Trypanosoma brucei* pela ligação e hidrólise de ATP

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Biologia da relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

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

Versão original

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Soares, Daiane da Rocha.
Modulação de Orc1/Cdc6 de Trypanosoma brucei pela ligação e hidrólise de ATP / Daiane da Rocha Soares. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Sabbaga, Maria Carolina Q. B. Elias.

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

Versão do título para o inglês: Modulation of *Trypanosoma brucei* Orc1/Cdc6 by ATP binding and hydrolysis.

1. Replicação do DNA 2. *T. brucei* 3. ATP 4. ATPase 5. Origem de replicação 6. DNA I. Sabbaga,Profa. Dra. Maria Carolina Q. B. Elias II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia III. Título.

ICB/SBIB025/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Daiane da Rocha Soares.

Título da Dissertação Modulação de Orc1/Cdc6 de Trypanosoma brucei pela ligação e hidrólise de ATP.

Orientador(a): Profa. Dra. Sabbaga, Maria Carolina Q. B. Elias.

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

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

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

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

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **511/12** referente ao projeto intitulado: "*Análise da importância da atividade de ATPase, de Orc/cdc6 de tripanossomas para a estabilidade do complexo de pré replicação do DNA*"" sob a responsabilidade de **Daiane da Rocha Soares,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 28 de março de 2012.

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

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

Agradecimentos

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e mostrar os caminho nas horas incertas.

Agradeço a minha família, pelo amor, dedicação e cuidado que me permitiram ser o que sou. Vocês são a minha base e o meu refúgio.

Ao meu namorado Alexandre. Por fazer parte da minha vida, por me apoiar, e por ter me ajudado tanto durante a realização deste trabalho. Te amo muito!

À minha orientadora Dra. Maria Carolina por acreditar em mim e me mostrar o caminho da ciência. Carol para mim é uma honra trabalhar e aprender com você. Obrigada pelo entusiasmo, pelo profissionalismo e pela competência científica.

À minha querida amiga e colega de trabalho Simone, por quem tenho grande admiração. Obrigada por tantas vezes me direcionar em meu trabalho, pelos ensinamentos, paciência e amizade. Sem você as coisas seriam muito mais difíceis pra mim, obrigada.

Ao Ricardo, pela amizade, por tudo que me ensinou e por ser essa pessoa tão alegre e divertida que muitas vezes me fez rir frente às dificuldades da pesquisa.

À Marina pela ajuda com o SMARD. Você é uma pessoa fofa, obrigada pela amizade.

Ao Raphael obrigada pela amizade e pela contribuição dada ao meu trabalho.

À Teresa por ter me ajudado com as transfecções e pela amizade que cultivamos. Tenho muita admiração por você Teresa, tanto como pessoa quanto como profissional.

À Carol Santa Cruz pela elaboração das modelagens moleculares.

À minha amiga Ediane Rebouças, que tem um coração enorme e me ajuda desde a faculdade e não foi diferente durante a elaboração deste trabalho.

Aos técnicos Mariana e Ivan por me ajudarem tanto durante o meu mestrado.

A todos os pesquisadores e alunos do CETICs que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial a Juliana Dias e a Milene Cristina, que sempre me ajudaram muito e tiraram com muita paciência e generosidade todas as minhas dúvidas. Tenho grande admiração e carinho por essas duas pessoas.

A uma pessoa muito especial. Dessas que sem nenhuma dúvida são colocadas em nossa vida por uma mão divina. Cecília, obrigada por tudo. Você é uma das pessoas de maior beleza interior que pude conhecer, continue assim.

Ao Dr. Sérgio Schenkman e todos os membros de seu laboratório que por diversas vezes me ajudaram.

Ao Dr. Ariel Silber e aos membros de seu laboratório que também contribuíram para a realização do meu trabalho.

A todos que colaboraram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Todo saber é vão, exceto quando há trabalho. E todo trabalho é vazio, exceto quando há amor. E quando se trabalha com amor, vós vos unis a vós próprios, e uns aos outros, e a Deus."

Khalil Gibra

Resumo

SOARES, D. R. **Modulação de Orc1/Cdc6 de *Trypanosoma brucei* pela ligação e hidrólise de ATP.** 2014. 93 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Para que a replicação do DNA genômico se inicie, é preciso que o complexo de pré-replicação (CPR) reconheça no DNA regiões que atuem como origens de replicação, nucleando assim o processo em pontos específicos do DNA. Em leveduras, o CPR é composto pelo complexo ORC (Orc 1-6), Cdc6, Cdt1 e o complexo MCM (Mcm 2-7). A associação de ORC à origem de replicação possibilita a interação desta com ambas as proteínas Cdc6 e Cdt1. ORC, Cdc6 e Cdt1 atuam juntas para estabilizar o complexo MCM nas origens. Nosso grupo demonstrou que a proteína Orc1/Cdc6, homóloga tanto a Orc1 quanto a Cdc6, é um componente da CPR nos tripanosomas. A sequência primária de Orc1/Cdc6 de *T.brucei* apresenta as regiões sensor 1 e 2 fundamentais para atividade de ATPase e os domínios Walker A e Walker B importantes para ligação de ATP. Nosso laboratório demonstrou que esta proteína recombinante hidrolisa ATP *in vitro.* Neste sentido, o objetivo deste trabalho é avaliar a importância da hidrólise e ligação de ATP para a formação e estabilidade do complexo de pré-replicação de *T.brucei.* Para tanto, foram geradas proteínas recombinantes Orc1/Cdc6 de *T.brucei* mutadas nas regiões Walker A (TbOrc1/Cdc6K79T) ou sensor 2 (TbOrc1/Cdc6R251,252E) incapazes de ligar ou hidrolisar ATP, respectivamente. Estes genes foram então clonados em vetores de expressão induzível para transfecção em células de *T.brucei*. Finalmente, as células expressando TbOrc1/Cdc6K79T ou TbOrc1/Cdc6R251,252E foram avaliadas quanto a (i) proliferação celular, (ii) estabilidade da interação Orc1/Cdc6-DNA, (iii) capacidade de estabilizar MCM no DNA, (iv) progressão do ciclo celular. A estrutura tridimensional de TbOrc1/Cdc6 foi obtida por modelagem computacional e exibe uma conservada arquitetura dos domínios *winged-helix* para interação com o DNA e com e dos domínios de interação com o ATP. A estrutura de ferradura de TbOrc1/Cdc6 parece ser altamente flexível e é potencialmente estabilizada pela ligação do ATP. A mutação na região sensor 2 de *T.brucei* (TbOrc1/Cdc6R251,252E) reduziu drasticamente a atividade de ATPase em comparação com a proteína selvagem. TbOrc1/Cdc6 mutado no sítio de ligação ao ATP perdeu a capacidade de interagir com o ATP (TbOrc1/Cdc6K79T). As análises estruturais do modelo de TbOrc1/Cdc6K79T e TbOrc1/Cdc6R251,252E mostraram alteração no sítio de ligação de ATP, explicando nossos resultados funcionais. Os genes TbOrc1/Cdc6K79T e TbOrc1/Cdc6R251,252E foram clonados em vetores para transfecção e foram transfectados nas formas procíclicas de *T.brucei*. A super expressão dos genes TbOrc1/Cdc6K79T ou TbOrc1/Cdc6R251,252E em formas procíclicas inibiu de forma significativa a proliferação celular, causou ineficiência no carregamento de MCM para o DNA e ocasionou falhas na progressão do ciclo celular, atrasando a fase S. Estes dados demonstram a importância da hidrólise do ATP por Orc1/Cdc6 na montagem do complexo de pré-replicação, contribuindo para o conhecimento da biologia da replicação do DNA em *T.brucei*. Mais que isto, apresenta regiões específicas

de Orc1/Cdc6 que devem ser utilizadas como alvos de drogas para o combate da doença do sono.

Palavras-chave: Replicação do DNA. *T.brucei*. ATP. ATPase. Origem de replicação. DNA

Abstract

Soares DR. **Modulation of *Trypanosoma brucei* Orc1/Cdc6 by ATP binding and hydrolysis.** 2014. 93 p. masther thesis (parasitology). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

DNA replication initiates when the pre - replication complex (CPR) recognizes DNA regions that acts as origins of replication. In yeast, the CPR is composed by ORC (Orc1-6), Cdc6, CDT1 and the MCM complex (Mcm 2-7). The association of the ORC with the origin of replication allows its interaction with both Cdt1 and Cdc6 proteins. ORC, Cdc6 and CDT1 act together to stabilize the MCM complex at the origins. Our group demonstrated that Orc1/Cdc6 protein homologous to both Orc1 and Cdc6, is a component of CPR in trypanosomes. The primary sequence of *T.brucei* Orc1/Cdc6 shows the sensor 1 and 2 regions essential for ATPase activity and Walker A and Walker B domains important for ATP binding. Our laboratory has demonstrated that these recombinant proteins hydrolyze ATP *in vitro*. The objective of this study is to evaluate the importance of ATP binding and hydrolysis to PRC formation and stability in *T.brucei*. For this purpose, in order to block the ATP binding or hydrolizes *T.brucei* Orc1/Cdc6 mutated recombinant proteins were generated replacing one aminoacid at Walker A (TbOrc1/Cdc6K79T) or two sensor 2 (TbOrc1/Cdc6R251,252E). These mutated genes were also cloned into inducible expression vectors for transfection into *T.brucei* procyclic cells. Finally, cells expressing TbOrc1/Cdc6K79T or TbOrc1/Cdc6R251,252E were evaluated for (i) cell proliferation, (ii) stability of Orc1/Cdc6 - DNA interaction, (iii) ability to stabilize MCM onto DNA and (iv) progression of the cell cycle. TbOrc1/Cdc6 tridimensional structure was obtained by computational modeling and exhibited a conserved architecture with winged-helix domains for interaction with DNA and with sub-domains for ATP binding. The “horseshoe-shaped” structure of the protein appears to be highly flexible and potentially stabilized by the binding of ATP. The mutation in the sensor 2 region of *T.brucei* (TbOrc1/Cdc6R251,252E) drastically reduced the ATPase activity compared to the wild-type protein. Recombinant TbOrc1/Cdc6 mutated in the ATP binding site has lost the ability to interact with ATP. Structural analyses of TbOrc1/Cdc6K79T model showed that it alters the ATP binding pocket, explaining our functional results. The overexpression of TbOrc1/Cdc6K79T or TbOrc1/Cdc6R251252E genes significantly inhibited cell proliferation causing inefficient loading of MCM onto DNA and altered cell cycle progression by delaying the phase S. These data suggest that ORC1/Cdc6 migth hydrolyses ATP it in order to recruit MCM onto replication origins. Moreover, it presents specific regions of Orc1/Cdc6 that migth be considered as target for development of new drugs against *T.brucei.*

Key-words: DNA replication. *T.brucei*. ATP. ATPase. Origin of replication. DNA

Lista de Abreviaturas

ATP: Adenosina Trifosfato

BSA: Soro albumina bovina

CaCl2: Cloreto de Cálcio

CDK: Cyclin Dependent Kinase

C-terminal: Carboxi-terminal

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNase: desoxirribonuclease

dNTP: desoxirribonucleosídeo trifosfatado

DO: Densidade Óptica

EDTA: Ácido etileno diamino tetra-acético

EGTA: Ácido etilonoglicol-bis-aminoletertetracético

HCl: Ácido clorídrico

IPTG: Isopropyl-D-thiogalactopyranoside

Kb: kilobase

KCl: Cloreto de potássio

kDa: kilo Dalton

KH2PO4: Fosfato de potássio dibásico

LB: Meio de cultura de bactérias (Luria Bertani)

MBP: *Maltose Binding Protein*

MCM: *Minichromosome Maintenance*

MgCl2: Cloreto de Magnésio

MgSO4: Sulfato de magnésio

Na2HPO4: Fosfato de sódio dibásico

NaCl: Cloreto de sódio

N-terminal: Amino-terminal

ORC: *Origin Recognition Complex*

pb: Pares de bases

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

PCR: Reação de polimerase em cadeia

RNAi : Ácido ribonucléico de interferência

rpm: Rotações por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio

TAE: Tris-Acetato-EDTA

TCA: Ácido tricloroacético

TE: Tampão Tris-EDTA

TEMED: N, N, N’, N’, tetrametil 1, 2 diaminometano

Tris: Tris (hidroximetil)-aminometano

U: Unidades

µg: Micrograma

µL: Microlitro

UV: Ultravioleta

Lista de tabelas

Tabela 1- Complexos envolvidos na replicação do DNA nos diversos organismos 23

Tabela 2 - Componentes do meio SDM-79 40

Tabela 3 - Oligonucleotideos utilizados na mutagênese 42

Tabela 4 - Oligonucleotideos utilizados no sequenciamento 48

Tabela 5 - Anticorpos primários utilizados 52

Tabela 6 - Oligonucleotideos usados na construção dos mutantes para o pLew82 54

Tabela 7 - Componentes do tampão *Cytomix* 56

Tabela 8 - Parâmetros utilizados para análise do ciclo celular de Trypanosoma brucei no aparelho FACs BD Callibur..... 58

Lista de figuras

Figura 1- Arquitetura celular dos tripanossomas 20

Figura 2- Formas adquiridas durante o ciclo de vida de *T.brucei* 22

Figura 3- Complexo de pré–replicação em bactérias 25

Figura 4- Complexo de pré–replicação em Archaea 26

Figura 5- Complexo de pré–replicação em metazoários e leveduras 27

Figura 6- Esquema representativo da estrutura de Cdt1 29

Figura7- Esquema estrutural das proteínas do complexo ORC de *S.cerevisiae* 30

Figura 8- Esquema estrutural das proteínas do complexo MCM 31

Figura 9- Esquema estrutural das proteínas do complexo ORC de *S.cerevisiae* 32

Figura 10- Comparação entre o CPR dos tripanosomatideos e o CPR de Archaea 34

Figura 11- Representação esquemática dos domínios característicos da família AAA+ de ATPases 35

Figura 12- Representação esquemática da montagem do CPR incluindo o papel do ATP e sua hidrólise 37

Figura 13- Sequência primária de Orc1/Cdc6 de *T.brucei* 38

Figura 14- Esquema representativo das etapas para a realização das mutações 45

Figura 15- Representação do vetor de clonagem pJET 1.2 46

Figura 16- Representação do vetor de expressão em E.coli pMAL-c2X 49

Figura 17- Representação do vetor de expressão para células de *T.brucei* 54

Figura 18- Overlap PCR para obtenção dos fragmentos de DNA contendo as mutações em TbOrc1/Cdc6 60

Figura 19- Clonagem e sequenciamento de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E 61

Figura20 - Expressão e purificação de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E 62

Figura 21 - Ensaio de Atividade de ATPase de TbOrc1/Cdc6R251,252E 63

Figura 22 - Ensaio de ligação de ATP de rTbOrc1/Cdc6K65T 64

Figura 23 - Modelagens moleculares de TbOrc1/Cdc6, TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E 65

Figura 24 - Cassete de expressão pLew82 67

Figura 25 - Clonagem e transfecção de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E para expressão em T.brucei 67

Figura 26 - *Western blotting* da expressão de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E em células de T.brucei 69

Figura 27 - Gráfico da curva e crescimento das células expressando TbOrc1/Cdc6K65T ou TbOrc1/Cdc6R251,252E 71

Figura 28 - Extrato diferencial de células expressando TbOrc1/Cdc6K65T ou TbOrc1/Cdc6R251,252E 74

Figura 29 - Duas representações do gráfico de citômetria de fluxo de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E 75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

1.1 **Tripanossomas** 19

1.1.1 ***Trypanosoma brucei*** 21

1.1.2 ***Ciclo de vida*** 21

1.2 Replicação do DNA 23

1.3 Iniciação da replicação nos diferentes organismos 24

1.3.1 ***Bactérias*** 24

1.3.1.1 ***Controle da replicação em bactérias*** 25

1.3.2 Archaea 25

1.3.3 Metazoários e leveduras 27

1.3.3.1 ***Controle da replicação em metazoários e leveduras*** 28

1.3.4 Proteínas do CPR de metazoários e leveduras 29

1.3.4.1 ***Cdt1*** 30

1.3.4.2 ***Cdc6*** 30

1.3.4.3 ***MCM*** 31

1.3.4.4 ***ORC*** 31

1.3.4.5 ***ORC além da replicação*** 32

1.3.5 ***Tripanossomas*** 33

1.3.5.1 ***Controle da replicação em tripanosomas*** 34

1.4 Importância da ligação e hidrólise do ATP para montagem do CPR dos eucariotos 35

1.4.1 ***Montagem do CPR e o papel da ligação e hidrólise do ATP nesse contexto*** 37

1.4.2 ***Atividade de ATPase de Orc1/Cdc6 em T.brucei*** 38

2 OBJETIVOS 39

2.1 Objetivo geral 39

2.2 Objetivos específicos 39

3 MATERIAL E MÉTODOS 40

3.1 Cultura 40

3.2 Extração DNA genômico dos parasitas 41

3.3 Mutagênese de Orc1/Cdc6 de *T.brucei* 41

3.4 Clonagem dos genes mutados 45

3.5 Preparo de Bactérias Termocompetentes (Escherichia coli) 46

3.6* Transformação em *E. coli 47

3.7 Extração de DNA plasmidial (*Lise Alcalina*) 47

3.8 Digestão com enzimas de restrição 47

3.9 Sequenciamento de nucleotídeos 48

3.10 Subclonagem e expressão no vetor de pMAL c2X 49

3.11 Purificação por afinidade de rTbOrc1/Cdc6R251,252E e rTbOrc1/Cdc6K65T em coluna de amilose 50

3.12 Eletroforese de proteínas em gel SDS-Poliacrilamida 50

3.13* *Western Blotting 51

3.14 Atividade de ligação ao nucleotídeo ATP 51

3.15 Atividade de ATPase 52

3.16 Predição estrutural de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E 52

3.17 Construção no pLew82 53

3.18 Transfecção nas formas procíclicas de *T. brucei* 54

***3.19* Indução da expressão de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E e curva de crescimento** 56

3.20 Citometria de Fluxo 56

3.21 Extrato Diferencial 57

4 RESULTADOS 58

4.1 Mutagênese sítio dirigida da proteína TbOrc1/Cdc6.....58

4.2 Obtenção da Proteína recombinante TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E 60

4.3 Caracterização funcional de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E 61

4.3.1 *Ensaio de ATPase de rTbOrc1/Cdc6R251,252E* 61

4.3.2 *Ensaio de ligação de rTbOrc1/Cdc6K65T ao ATP* 62

4.3.3 *Modelagens moleculares de TbOrc1/Cdc6, TbOrc1/Cdc6K65T TbOrc1/Cdc6R251,252E* 63

4.4 Caracterização do papel da ligação e da hidrólise do ATP de Orc1/Cdc6 em células de *T.brucei* 65

4.4.1 *Clonagem de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E em vetores de expressão em células de T. brucei*.....65

4.4.2 *Transfecção de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E em células de T.brucei* 68

4.4.3 *Indução da expressão de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E* 68

4.4.4 *Curva de crescimento celular* 69

4.4.5 *Extrato diferencial de células de T.brucei expressando TbOrc1/Cdc6K65T ou TbOrc1/Cdc6R251,252E* 71

4.4.6 *Citometria de fluxo*.....74

5 DISCUSSÃO.....76

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 80

Referências* 81

APÊNDICES – Artigos de Periódicos..... 90

1 INTRODUÇÃO

A replicação do DNA é um processo altamente complexo e sofisticadamente regulado, de forma a assegurar a transmissão fiel do material genético em cada divisão celular. O inicio da replicação se dá com a montagem do complexo de proteínas responsáveis por reconhecer e recrutar para a origem de replicação os componentes que de fato atuarão na replicação do DNA. Este complexo é denominado complexo de pré-replicação (CPR). O mecanismo de replicação é bem conservado nos eucariotos superiores, porém os tripanossomas, que divergiram muito cedo na escala evolutiva e que apresentam uma organização genômica peculiar, apresentam um complexo de replicação peculiar.

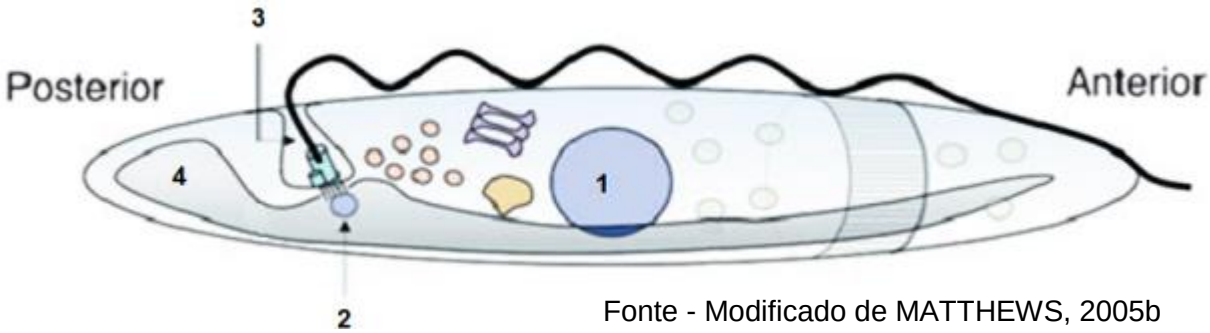
1.1 Tripanossomas

Os tripanossomas são eucariotos unicelulares flagelados que parasitam diversas plantas e animais. Pertencem ao supergrupo de protistas *escavatas*, a ordem *Kinetoplastida* e são membros da família *Tripanossomatidae.* Possuem organelas características como a bolsa flagelar, de onde emerge o flagelo e uma única mitocôndria ramificada ao longo de toda a célula onde está contido o cinetoplasto. O cinetoplasto abriga o DNA organizado sob a forma de círculos grandes (maxicírculos) e círculos pequenos (minicírculos) que apresentam um mecanismo de replicação distinto e independente do DNA nuclear (ENGLUND; GUILBRIDE, 1998) (figura 1). Além disso, a mitocôndria destes organismos realiza um processo chamado “edição do RNA”, presente somente nos tripanosomatídeos. Neste processo um complexo de proteínas chamado “editossomo” insere ou remove uridinas do transcrito primário (STUART et al., 2005).

A organização da cromatina é similar ao observado nos demais eucariotos, mas com algumas exclusividades. A cromatina não se condensa em cromossomos visíveis durante a mitose e a membrana nuclear permanece intacta durante este processo. A regulação epigenética nos tripanossomas é pouco conhecida e a composição das histonas é divergente dos demais eucariotos (BRINGAUD et al., 2008).

Os tripanossomatídeos não possuem sequências promotoras no DNA nem mesmo íntrons, além disso, a transcrição é policistrônica (LEE; VAN DER PLOEG, 1997). O processamento do RNA primário se dá por *trans-splicing*, onde ocorre o processamento em transcritos independentes e a sequência do mini-exon de 39 nucleotídeos é adicionada à extremidade 5' de cada RNA mensageiro (TSCHUDI; ULLU, 1991). A existência de mecanismos de controle transcricional é desconhecida nos tripanossomas e não foram localizados transposons, somente retrotransposons, diferente dos eucariotos superiores (BRINGAUD et al., 2008). Dentre os membros da família *Trypanosomatidae* destacam-se, pela importância médica e econômica, os agentes causais das leishmanioses e tripanosomíases humanas (Doença de Chagas e Doença do sono). Este trabalho abordará exclusivamente o *Trypanosoma brucei.*

Figura 1- Arquitetura celular dos tripanossomas



Fonte - Modificado de MATTHEWS, 2005b

Representação simplificada das principais estruturas celulares dos tripanossomas. 1. Está sendo indicado o núcleo, 2. o cinetoplasto, 3. a bolsa flagelar e 4. a mitocôndria.

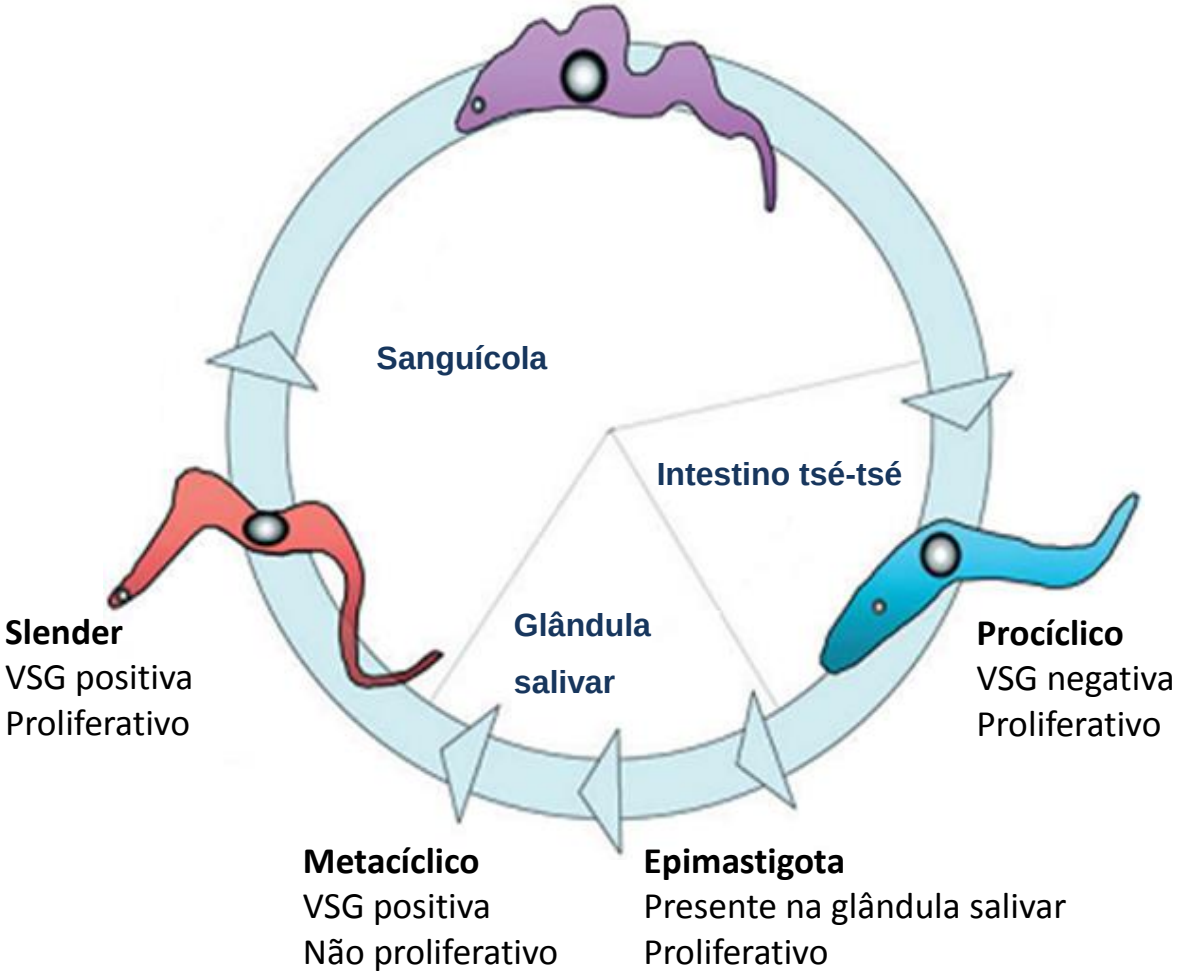
1.1.1 Trypanosoma brucei

O *Trypanosoma brucei* é o agente etiológico da Doença do sono subdividido em duas espécies, o *Trypanosoma brucei gambiense,* responsável por 98% dos casos da doença, e o *Trypanosoma brucei rhodesiense,* responsável por 2% da doença. A distribuição desses tripanosomas é exclusiva da África, pois sua transmissão depende de moscas do gênero Glossina, mais conhecidas como moscas tsé-tsé endêmicas da África.

1.1.2 Ciclo de vida

A mosca tse-tsé (Glossina spp.) injeta formas tripomastigotas metacíclicas durante seu repasto sanguíneo. Esta forma expressa as VSG´s (glicoproteínas variantes de superfície) e não é replicativa, os parasitas invadem o sistema linfático e a corrente sanguínea onde transformam-se em tripomastigotas sanguícolas, sendo denominado *slender* (figura 2*)*. Esta forma possui morfologia alongada e trata-se do estágio sanguícola proliferativo, os quais são carreados para outros locais do corpo, como os fluídos (linfa, líquido cérebro-espinal) e se replicam por fissão binária. Durante todo o ciclo o *T.brucei* assume apenas estágios extracelulares. No processo de divisão são geradas as formas tripomastigotas sanguícolas não replicativas (*stumpy*), que infectam a mosca tse-tsé durante o repasto sanguíneo (MATTHEWS, 2005a). No intestino médio do inseto os parasitas se transformam em tripomastigotas procíclicos onde se multiplicam por fissão binária. Esta forma não expressa VSG´s e não é replicativa. Os parasitas deixam o intestino, se transformam em epimastigotas, forma proliferativa que atinge as glândulas salivares, onde se multiplica por fissão binária transformando-se novamente em tripomastigotas metacíclicas. O ciclo no inseto dura aproximadamente 3 semanas.

Figura 2- Formas adquiridas durante o ciclo de vida de *T.brucei*



Fonte - Modificado de MATTHEWS, 2005

Formas adotadas durante o ciclo de vida de *T.brucei*: Abaixo as formas presentes no vetor inseto: as formas procíclicas, epimastigotas e metacíclicas. Acima as formas presentes no mamífero: a forma sanguícula replicativa (*slender*) e não replicativa (*stumpy*)

1.2 Replicação do DNA

A replicação do DNA é crucial para proliferação celular. A grande conservação dos fatores de replicação sugere fortemente que o mecanismo básico de replicação do DNA é evolutivamente conservado nos três domínios (Bactéria, Archaea e Eucariotos). Contudo, também existem evidências de que o modo de reconhecimento e disparo de uma origem de replicação é significativamente mais complexo em eucariotos do que em procariotos (MASAI et al., 2010). O principio básico da replicação é o mesmo entre eucariotos e procariotos. No entanto, os eucariotos possuem uma maquinaria protéica mais complexa, além de possuírem múltiplas origens de replicação ao longo do cromossomo, enquanto que os procariotos possuem apenas uma origem de replicação (tabela 1).

Tabela 1- Complexos envolvidos na replicação do DNA nos diversos organismos

Stage in DNA replication	Bacteria	Archaea	Eukaryotes
Define origin	DnaA	Orc 1/Cdc6, WhiP	Orc (Orc 1, 2, 3, 4, 5, and 6)
Recruit helicase	DnaC, DnaB	Orc 1/Cdc6, MCM6	Cdt1, Cdc6, MCM (2–7)
Pre-initiation complex	–	GINS (Gins23 and Gins15)	GINS (Psf1, 2, 3 and Sld5), MCM10, Cdc45, Sld2, Sld3, Dbp11
Priming	DnaG	Primase (PriS and PriL)	Pol α/primase (PRIS, PRIL, B subunit, DNA polα)
DNA synthesis	DNA pol III core τ-subunit, Clamp loader proteins (γ-complex), Sliding clamp proteins (β-clamp)	B family DNA pol, D family DNA pol*, Clamp loader proteins (RFC), Sliding clamp proteins (PCNA)	B family DNA pol (δ and ε), Clamp loader proteins (RFC), Sliding clamp proteins (PCNA)
Primer removal	DNA pol I, RNaseH, DNA ligase (NAD-dep)	Fen1, Dna2, RNaseHII?, DNA ligase (ATP-dep)	Fen1, Dna2, RNaseHII?, DNA ligase (ATP-dep)

Fonte - Modificado de MCGEOCH; BELL, 2008

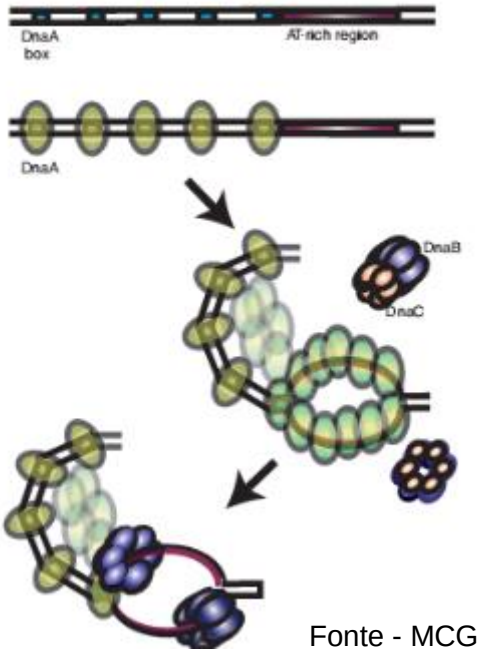
A replicação do DNA envolve uma série de estágios: A fase de iniciação ocorre no final da mitose, inicio de G_1. Nesta fase ocorre a montagem do complexo que define o sítio de inicio da replicação e recruta para este as proteínas que atuarão de fato no processo de duplicação do DNA. Este complexo é denominado “complexo de pré-replicação” (CPR). A iniciação deve ser extremamente regulada, de forma que e a replicação ocorra uma única vez por ciclo celular. A fase de ativação ocorre no inicio da fase S quando há aumento da atividade de ciclinas CDKs (ciclinas dependentes de kinases). Nesta fase ocorre a ativação das helicases, promovendo a abertura da dupla fita de DNA, o que permitirá que as proteínas de replicação tenham acesso ao DNA de simples fita (BELL ; DUTTA, 2002). A fase de elongação ocorre na fase S, onde os iniciadores são sintetizados pela enzima primase, ocorrendo o recrutamento da polimerase, o estabelecimento dos fatores da forquilha e o processamento dos fragmentos de okazaki (BELL; MCGEOCH , 2008).

1.3 Iniciação da replicação nos diferentes organismos

1.3.1 Bactérias

Em bactérias o complexo de pré-replicação é formado pela proteína iniciadora DnaA, que reconhece uma única origem denominada oriC e carrega a helicase DnaB para esta origem (LEONARD, A. C., 2010). A origem de replicação em bactérias possui cerca de 245bp e é rica em AT, sendo denominada DNA boxes (KAGUNI, 2006). A DnaA inicia a abertura da dupla fita de DNA, em seguida a DnaC, irá estabilizar o DNA simples fita, recrutando para a origem DnaB que irá promover a abertura da dupla de DNA (figura 3). A replicação do DNA em bactérias é bem mais rápida do que em eucariotos, durando no máximo 30 minutos, porém a taxa de erros durante a replicação é substancialmente maior do que em eucariotos (KAGUNI, 2006).

Figura 3 - Complexo de pré-replicação em bactérias



Fonte - MCGEOCH; BELL, 2008

A proteína DnaA (verde) se liga ao DnaA boxes (região azul) levando a distorção do DNA e facilitando seu acesso a região rica em AT do DNA (região vermelha). A DnaB (azul) formando um complexo com a DnaC (laranja) são recrutadas, seguida pela dissociação de DnaC.

1.3.1.1 Controle da replicação em bactérias

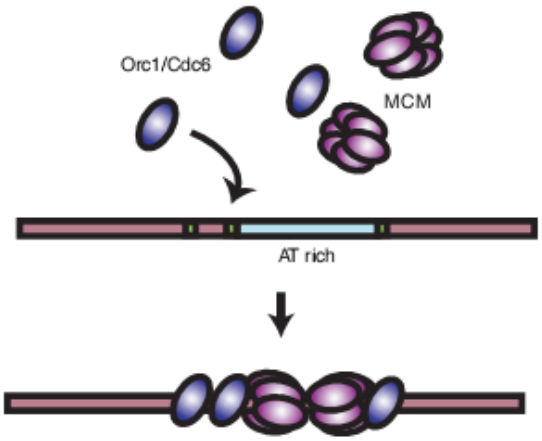
Semelhante aos eucariotos as bactérias também possuem mecanismos regulatórios para evitar a re-replicação. E em *E.coli* esse controle está na iniciadora DnaA. A DnaA livre se associa com a origem de replicação e em seguida se associa com o ATP. A associação de DnaA-ATP torna a DnaA inativa, ou seja, incapaz de reconhecer novas origens de replicação. A ligação DnaA-ATP é revertida por meio da hidrólise para a forma nativa DnaA-ADP tornando o complexo de pré-replicação novamente funcional (KATAYAMA et al., 1998). Outro mecanismo de controle da re-replicação em procariotos é a metilação de uma das fitas das origens de replicação (hemi-metilação). As origens em bactérias são ricas em sítios GATC. Quando esse sítios são hemi-metilados são reconhecidos por SeqA, uma proteína que possui alta afinidade por sítios GATC metilados. A ligação da SeqA à origem de replicação impede que a iniciadora DnaA reconheça a origem, bloqueando assim a montagem do CPR. (LU et al., 1994).

1.3.2 Archaea

O complexo de pré-replicação em Archaea apresenta características semelhantes a eucariontes e a procariontes. É um fato justificável, pois Archea está entre estes dois grupos na escala evolutiva.

Assim como eucariontes, Archaea possui múltiplas origens de replicação, entretanto estes organismos também apresentam elementos conservados com sítios de ligação específicos para ligação do iniciador, que são ricos em AT (ROBINSON et al., 2004). O complexo iniciador em Archaea não é constituído por seis polipeptídeos diferentes como o complexo Orc1-6 de eucariontes. Ao contrário, existe uma proteína semelhante tanto a Orc1 quanto a Cdc6, denominada Cdc6/Orc1 (DE FELICE et al., 2006). Outro aspecto peculiar da maioria dos representantes de Archaea é a existência de apenas um polipeptídio de MCM que forma um homohexâmero apresentando atividade de helicase (figura 4) (CHONG et al., 2000). Diferindo de eucariotos e procariotos, não foi encontrado nenhum mecanismo de controle de replicação em Archaea (COSTA et al., 2013).

Figura 4 - Complexo de pré-replicação em Archaea



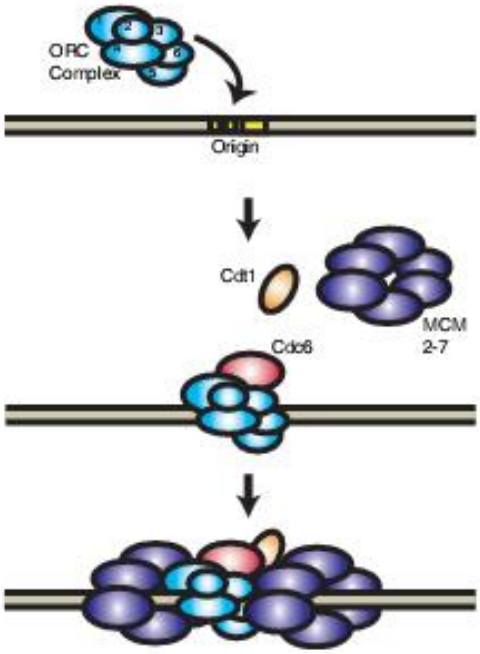
Fonte – MCGEOCH; BELL, 2008

No retângulo azul está a origem de replicação reconhecida por Orc1/Cdc6 (azul escuro), esta única proteína se liga a origem de replicação e é capaz de recrutar a helicase MCM (roxo).

1.3.3 Metazoários e leveduras

Em metazoários e leveduras o complexo de pré-replicação (CPR) é formado pelo complexo de reconhecimento de origem ORC (*Origin Recognition Complex*), que é responsável pela iniciação da replicação e possui seis subunidades, Orc1-Orc6 (figura 5). Nos metazoários não existe um consenso de sequência que ORC reconhece como origem de replicação e aparentemente esta determinação da origem é influenciada por outros parâmetros, dentre eles a estrutura da cromatina (SEQUEIRA-MENDES et al., 2009). Diversos estudos correlacionam o disparo de origens de replicação com a transcrição, pois algumas origens tendem a se localizar em regiões de cromatina mais aberta e acessível, onde existe alto índice de modificações epigenéticas (GILBERT, 2002).

Figura 5- Complexo de pré-replicação em metazoários e leveduras



Fonte- MCGEOCH; BELL, 2008

A origem é reconhecida pelo heterohexâmero ORC (azul claro), em seguida Cdc6 é carregada (vermelho) e posteriormente Cdt1 (laranja) é recrutada para a origem ligada as helicases MCM2-7 (azul escuro).

Além disso, origens de replicação que se encontram próximas de ilhas CpG não metilada são replicadas antes do que aquelas cujas ilhas CpG estão metiladas (ARDELL et al., 2005) .

Em leveduras existe uma sequência específica de DNA que ORC reconhece como origem de replicação. E esta sequência foi denominada *Autonomous Replicating Sequences* – ARS. Esta sequência é uma região não codificante com cerca de 100-200pb tendo um consenso de 11pb A/TTTTAT/CA/GTTTA/T (MARAHRENS ; STILLMAN, 1992). Em *S. pombe* não há sequência consenso, mas o complexo ORC se liga preferencialmente em regiões ricas em AT (OKUNO et al., 1999).

Existem outras proteínas que se associam a ORC, uma delas é a iniciadora Cdc6 (figura 5) que ao se conjugar a ORC regula o tempo de início da replicação e recruta a proteína Cdt1 (figura 5), que participa do carregamento do complexo MCM2-7 (complexo de manutenção dos minicromossomos) para a origem de DNA (BELL; STILLMAN, 2002). O complexo MCM2-7 é composto por seis subunidades, Mcm2 a Mcm7, possui atividade de helicase, e quando este complexo é carregado, a origem encontra-se licenciada para iniciar a replicação. Durante o carregamento de MCM2-7, Cdt1 é liberada do DNA de maneira ATP-dependente (RANDELL et al., 2008) e o hexâmero de MCM2-7 envolve a dupla fita de DNA. Na fase S MCM 2-7 torna-se ativo e atua como helicase replicativa juntamente com Gins e Cdc45.

1.3.3.1 Controle da replicação em metazoários e leveduras

Após a entrada na fase S, diversos mecanismos de controle para que uma mesma região do genoma não seja replicada mais de uma vez são ativados. Em metazoários a principal via de controle da re-replicação ocorre por meio da diminuição da atividade de Cdt1, já que esta é inativada em todos os metazoários. Ao final de G1 e início de S parte das moléculas de Cdt1 são fosforiladas por CDK, ubiquitinadas e em seguida degradadas. Outra parte das moléculas de Cdt1 podem se ligar a geminina, o que impede não só a sua degradação, mas também sua interação com MCM2-7 (WOHLSCHLEGEL et al., 2000). Em humanos existe um controle de replicação em Cdc6, pois esta é fosforilada e exportada do núcleo durante a fase S, ficando no citoplasma durante as fases G2 e Mitose (PETERSEN et al., 1999). E na transição das fases Mitose/G1 é degradada para ser

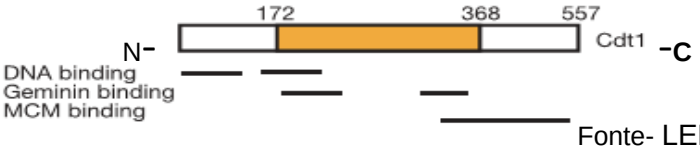
resintetizada na fase G1 (MENDEZ ; STILLMAN, 2003). Em mamíferos e leveduras o controle da replicação parece estar concentrado em Orc1, pois as Orcs de 2 a 6 permanecem ligadas à cromatina durante o ciclo celular. Na fase S, Orc1 é ubiquitinada e degradada pelo proteossomo. Na transição da fase M para G1 de um novo ciclo a Orc1 é resintetisada para que o complexo de pré-replicação possa ser formado (DE PAMPHILIS, 1993). Em *Saccharomyces cerevisiae* ORC permanece ligado à cromatina durante todo ciclo celular, porém durante a transição da fase G1/ S as subunidades Orc1, Orc2 e Orc6 são fosforiladas pelo complexo CDK1/Clb. Esta fosforilação impede a formação do CPR, 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 (NGUYEN et al., 2001).

1.3.4 Proteínas do CPR de metazoários e leveduras

1.3.4.1 Cdt1

A proteína Cdt1 (*chromatin licensing and DNA replication factor 1*) se liga ao homohexâmero MCM e ao interagir com Cdc6 recruta MCM para a origem de replicação. Sua estrutura é composta pelo domínio N-terminal, de ligação ao DNA (LEE et al., 2004). Por um domínio de interação com o monômero de Geminina, o qual interage com Cdt1 deixando esta inapta a compor novos complexos de pré-replicação. E finalmente, possui a região C-terminal que é composta pelo domínio WH (*winged helix*) (figura 6). A função característica desse domínio é interagir com o DNA, entretanto em Cdt1 o WH promove a interação Cdt1-MCM (KHAYRUTDINOV et al, 2009).

Figura 6- Esquema representativo da estrutura de Cdt1



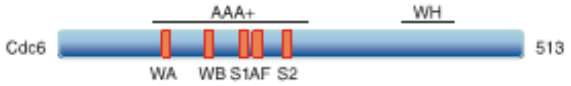
Fonte- LEE et al., 2004

Na região N-terminal os traços indicam a localização do domínio de ligação ao DNA. Na região mediana o domínio de interação com Geminina. E na região C-terminal do domínio WH.

1.3.4.2 Cdc6

A proteína Cdc6 (*cell division cycle*) (58 KDa) foi primeiramente isolada em *S.cerevisiae* (58 KDa) e classificada como integrante do complexo de pré-replicação (HARTWELL, 1976). Cdc6 é estruturalmente semelhante à proteína Orc1 devido a presença do domínio AAA+, os motivos Walker A e Walker B e as regiões sensor 1 e 2 (figura 7) (DUNCKER et al.,2009). Além disso, tal como Orc1, Cdc6 apresenta uma atividade de ATPase *in vitro* (SPECK; STILLMAN, 2007).

Figura 7 - Esquema estrutural das proteínas do complexo ORC de *S.cerevisiae*



Fonte - Modificado de KAWAKAMI; KATAYAMA, 2010

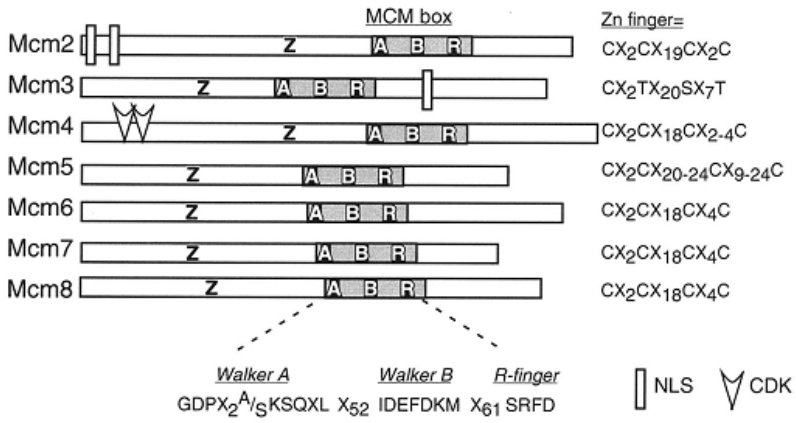
Neste esquema estrutural, está destacado a estrutura dos domínios importantes de cdc6 de *S.cerevisiae* bem como os motivos característicos da família AAA+ de ATPases. O número total de aminoácidos é descrito ao término da estrutura

1.3.4.3 MCM

O complexo MCM é composto por seis subunidades, e foi primeiramente caracterizado em leveduras e nomeado como fator que suporta a manutenção do minicromosomo (FORSBURG, 2004). Este complexo é recrutado para a origem de replicação na fase G1 do ciclo celular, mas atua como helicase replicativa na fase S, promovendo assim, o licenciamento das origens de replicação (COSTA; ONESTI, 2009).

MCM apresenta forma de anel, e após a ativação envolve a dupla fita do DNA promovendo atividade de helicase. De forma simplista, a estrutura de MCM é dividida em três domínios (COSTA; ONESTI, 2009). A região N - terminal com baixo grau de conservação, a região central apresenta o domínio AAA+ e a região C-terminal onde se encontra uma região hidrofóbica (figura 8), que é semelhante ao domínio WH que é localizado na região C-terminal das proteínas MCM encontradas em Archaea (ARAVIND; KOONIN, 1999).

Figura 8 - Esquema estrutural das proteínas do complexo MCM



Fonte - FORSBURG, 2004

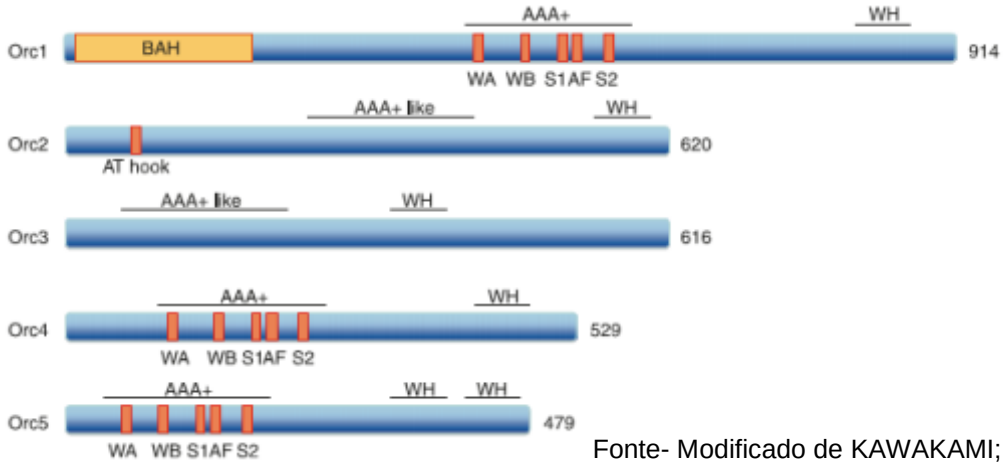
Neste esquema estrutural, está indicada a localização dos domínios importantes compartilhados por todas as proteínas do complexo MCM. Na região N-terminal, AAA+ de ATPases e na região C-terminal. O dedo de zinco está abreviado como “Z” na ilustração, o domínio walker A como “A”, walker B como “B” e o dedo de arginina como ” R ”

1.3.4.4 <u>ORC</u>

O complexo ORC foi purificado pela primeira vez em extrato celular de *S.cerevisiae,* ligado ao DNA correspondente á origem de replicação (BELL; STILLMAN, 1992). O heterohexâmero de ORC (413KDa) foi denominado por ordem decrescente segundo sua massa molecular em análise por gel SDS-PAGE: Orc1(120KDa), Orc2 (72KDa), Orc3(62KDa), Orc 4 (56KDa), Orc5 (53KDa) e Orc6 (50KDa). Orc1, Orc4 e Orc5 (figura 9) são membros da família AAA+ de ATPases. Devido à presença dos motivos característicos são capazes de se ligar ao ATP, mas apenas Orc1 pode também hidrolisá-lo (KLEMM et al., 1997). Além disso, em Orc1 de todos os eucariotos existe o domínio BAH (*Bromo adjacente homology*) que atua na interação proteína-proteína e está relacionado com o silenciamento de genes (KLEMM et al., 1997). Orc6 (figura 9) não possui homologia com as outras subunidades de ORC, devido à inexistência dos domínios característicos da família AAA+. Além disso, Orc6 não possui afinidade ao DNA e não é necessária para associação de ORC á origem. (KATAYAMA; KAWAKAMI, 2010). Entretanto, N- (1-185) e o C- (270-435) terminal de Orc6 interagem com Cdt1. Além

disso, foi demonstrado por meio de ensaios funcionais que Orc6 é requerida para o carregamento de Cdt1 á origem. (LEE; VAN DER PLOEG, 1997).

Figura 9 - Esquema estrutural das proteínas do complexo ORC de *S.cerevisiae*



Fonte- Modificado de KAWAKAMI; KATAYAMA, 2010

Neste esquema estrutural, estão destacadas as estrutura dos domínios importantes das subunidades de ORC de *S. cerevisiae,* bem como os motivos característicos da família AAA+ de ATPases. O número total de aminoácidos é descrito ao término de cada estrutura.

1.3.4.5 ORC além da replicação

A atuação de ORC no contexto da replicação é um assunto amplamente explorado e o papel de ORC nesta etapa do ciclo celular está bem caracterizado. No entanto, ORC enquanto complexo e as subunidades individualmente apresentam outras atividades celulares.

Em leveduras o recrutamento da proteína Sir1 pelo domínio BAH de Orc1é critico para o silenciamento de genes relacionado ao “tipo de acasalamento” ou *mating-type*, pois Orc1 pode se ligar diretamente a Sir1e promover o silenciamento do lócus HM de *mating-type* (BENMERZOUGA ET AL., 2013; GARTENBERG, 2000). Além disso, Orc1 de leveduras pode se ligar a origens de replicação localizadas na região sub-telomérica, pois quando acetilada na região N-terminal, promove o silenciamento de genes nesta região (BENMERZOUGA et al., 2013; GEISSENHONER et al., 2004). Um papel importante no silenciamento de genes também foi atribuído a Orc1/Cdc6 de *T.brucei,* pois apesar de não possuir o domínio BAH,

característico de Orc1 de levedura e importante no silenciamento de genes. TbOrc1/Cdc6 é necessária para o silenciamento de genes que expressam as VSGs na região sub-telomérica. O silenciamento de TbOrc1/Cdc6, por meio de RNAi, acarretou na desrepressão de VSGs tanto nas formas procíclicas (TIENGWE et al., 2012a), quanto nas formas sanguícolas (BENMERZOUGA et al., 2013).

Análises bioquímicas com ORC de mamíferos mostraram que Orc1 interage com a TRF2. Esta proteína se liga a sequência telomérica protegendo o telômero e participando do complexo de pré-replicação nesta região (TATSUMI et al. 2008). Além disso, Orc6 mostrou-se indispensável para segregação dos cromossomos durante a anáfase, pois o silenciamento da sua expressão resultou em mitose aberrante, formação de células multinucleadas e diminuição da replicação do DNA (PRASANTH et al., 2002).

Existem outras funções celulares nas quais ORC pode estar envolvida. Entretanto o seu papel especifico nestas funções ainda não está elucidado, o que indica a necessidade de mais estudos para entender a relevância global de ORC nas atividades celulares.

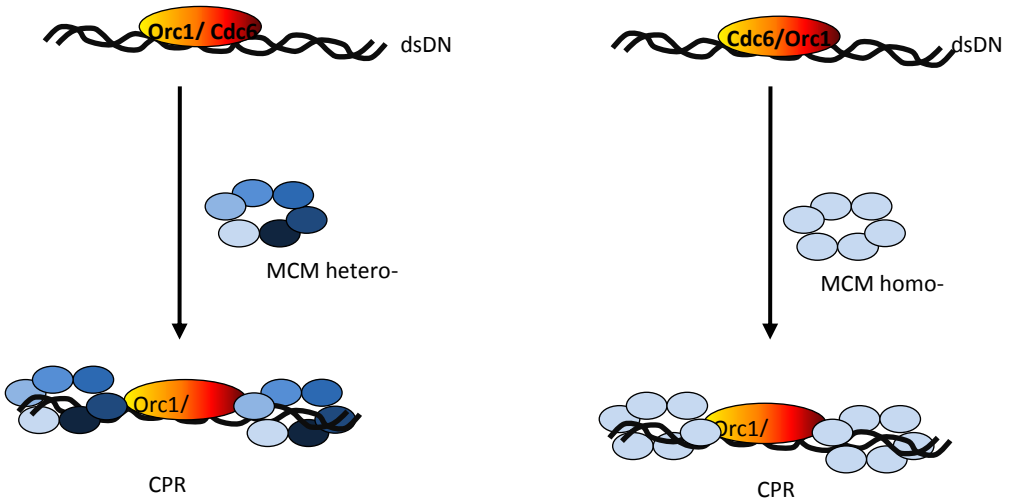
1.3.5 Tripanossomas

De acordo com o banco de dados do genoma de *T. cruzi* e *T. brucei* (tri try pdb.org) esses organismos não apresentam seis subunidades do complexo ORC, Cdc6 e Cdt1. Eles apresentam somente uma sequência, anotada como ORC1, que codifica uma proteína homóloga tanto a Orc1 quanto a Cdc6, denominada pelo nosso grupo Orc1/Cdc6 (figura 10).

Outras quatro sequências foram identificadas como putativas ORCs em *T.brucei*, TbOrc4,Tb7980, Tb3120 e TbOrc1b (DANG; LI, 2011; TIENGWE et al., 2012b). Estas sequências apresentam os domínios característicos da família AAA+ de ATPases e ensaios funcionais mostraram que estas interagem com Orc1/Cdc6 Estas proteínas recém-identificadas podem ser integrantes do CPR em *T.brucei*, entretanto ainda não foi evidenciada a participação destas na replicação. Esses organismos apresentam sequências similares a todas as subunidades do complexo MCM2-7. Foi demonstrado, por meio de interferência de RNA, que Orc1/Cdc6 faz parte do complexo de pré-replicação dos tripanossomas, pois ao inibir sua expressão obteve-se o

bloqueio da síntese de DNA. Além disso, Orc1/Cdc6 de *T. cruzi* e *T. brucei* complementaram Cdc6 em leveduras (GODOY et al., 2009). Diante disso, foi proposto que o CPR de tripanosomas é composto por Orc1/Cdc6 e MCM2-7, sendo aparentemente mais simples que o dos eucariotos superiores (figura 10). Cabe dizer que Orc1/Cdc6 de tripanosomas é homóloga a proteína Cdc6/Orc1 de Archaea (figura 10), que assim como tripanosomas, apresentam uma única proteína homóloga a Orc1 e Cdc6 e que é capaz de recrutar o homohexâmero de MCM presente nesses organismos (figura 6) (ATANASSOVA; GRAINGE, 2008).

Figura 10 - Comparação entre o CPR dos tripanosomatídeos e o CPR de Archaea



O complexo de pré-replicação de tripanosomas e de Archaea apresenta uma única proteína semelhante a Orc1 e a Cdc6 (laranja) que é capaz de reconhecer a origem de replicação e recrutar para esta, a helicase MCM. Em Archaea apenas uma subunidade de MCM está presente, formando um homohexâmero, já os tripanosomas apresentam todas as subunidades de MCMs de 2 a 7.

1.3.5.1 Controle da replicação em tripanosomas

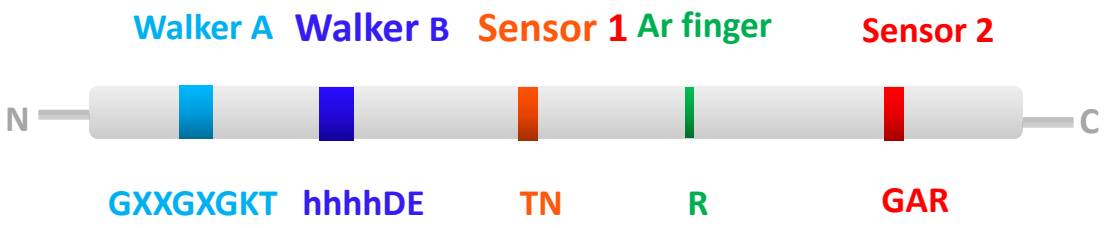
Atualmente sabe-se muito pouco sobre a regulação da replicação nuclear em tripanosomas. Mas é sabido que Orc1/Cdc6, MCM2-7 e Gins permanecem no núcleo durante todo o ciclo celular nas formas procíclicas, o que sugere que o mecanismo de controle da re-replicação não está na localização subcelular destes fatores (DANG; LI, 2011; GODOY et al., 2009). Cdc45 apresenta uma localização dinâmica, pois é nuclear de G1 a

G2, mas é exportada do núcleo durante a mitose (DANG; LI, 2011). Este mecanismo é ainda pouco conhecido, mas parece ser parte do controle da re-replicação em tripanosomas.

1.4 Importância da ligação e hidrólise do ATP para montagem do CPR dos eucariotos

No complexo de pré-replicação de eucariontes Cdc6 e Orc1-5 são membros da família AAA+ de ATPases (ATPases associadas a variadas atividades celulares). Os integrantes desta família possuem conservados elementos importantes para ligação e hidrólise do ATP (NEUWALD et al., 1999). Dentre os elementos conservados característicos da família AAA+ de ATPases estão os motivos Walker A e Walker B, as regiões sensor 1 e sensor 2 e o dedo de Arginina (*Ar finger*) (figura 11). Cdc6, Orc1 e Orc5 são capazes de ligar ATP, mas Cdc6 e Orc1 podem também hidrolisá-lo (RANDELL et al., 2006; SPECK; STILLMAN, 2007).

Figura 11- Representação esquemática dos domínios característicos da família AAA+ de ATPases



De forma simplificada a família AAA+ de ATPases possui os motivos conservados Walker A, Walker B, arginina *finger*, sensor 1 e sensor 2.

O motivo Walker A está envolvido na ligação e consequentemente na hidrólise do ATP, e a importância deste motivo para a integridade do CPR em eucariotos está bem caracterizada. Em Cdc6 de *S.cerevisiae* mutações na Lisina (K) conservada deste motivo causam a letalidade das células devido a falhas na ligação do ATP e sua hidrólise (HERBIG et al., 1999). Mutação equivalente (K114E) em ScOrc1 impede a formação do complexo com Cdc6 e a ligação deste complexo ao DNA (SPECK et al., 2005) e em HsOrc1, esta

mutação reduz em até 4 vezes sua ligação ao DNA (GIORDANO-COLTART et al., 2005).

Outro motivo responsável pela ligação e hidrólise de ATP é Walker B. Em ScCdc6 a substituição do glutamato conservado deste motivo por glicina não altera a formação do complexo com ORC mas altera a capacidade de ORC se ligar ao DNA (KLEMM et al., 1997). Em células de levedura, a substituição do ácido aspártico conservado deste motivo em Cdc6 por tirosina causa a morte celular, devido sua incapacidade de carregar MCM2-7 para a origem de replicação, além de falhas na liberação de Cdt1 do complexo, impedindo assim a sua ativação. (BOWERS et al., 2004).

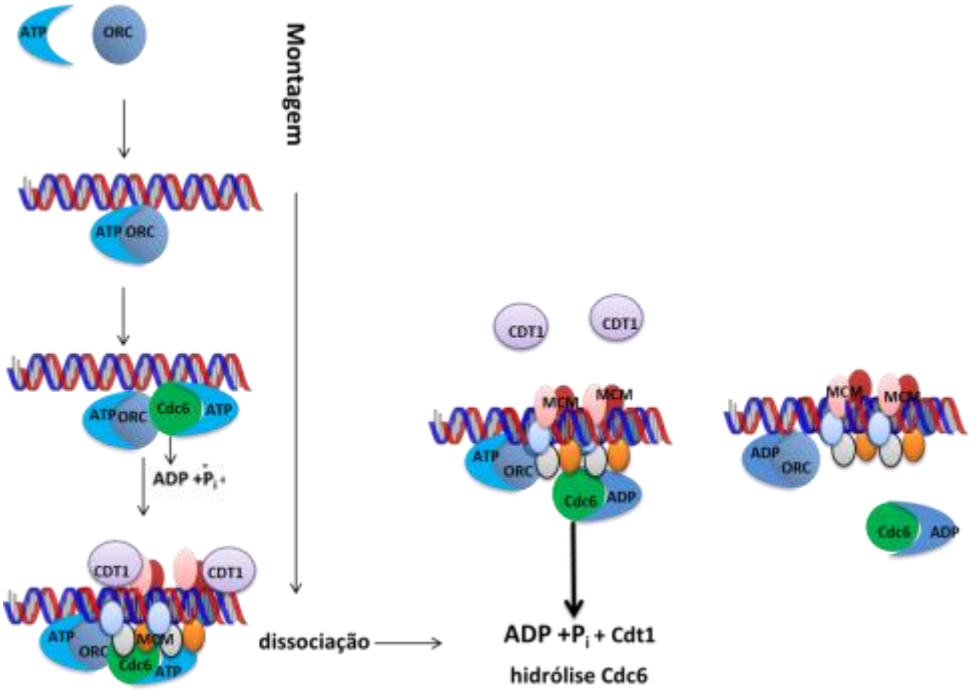
A função do dedo de arginina, também característico da família AAA+ de ATPases, foi pouco elucidada, mas um estudo com células de leveduras mostrou que este é essencial para viabilidade celular, pois as células com mutações neste resíduo de Arginina em Orc4 foram incapazes de crescer. Além de possuírem falhas no recrutamento de MCM2-7 para o DNA (BOWERS et al., 2004).

As regiões sensor 1 e sensor 2 possuem funções menos caracterizadas dentre os diversos organismos do que Walker A e Walker B, mas sabe-se que eles são importantes para atividade de ATPase dos membros da família AAA+. Esses motivos são capazes de detectar o ATP ou ADP ligado no sítio de ligação (Walker A e Walker B) e regular a sua hidrólise (LENZEN, 1998). Em ensaios *In vitro*, mutantes de Cdc6 de leveduras na região sensor 1 interagem com ORC, mas o carregamento de MCM2-7 e a liberação *de* Cdt1 são reduzidos significativamente (EVRIN et al., 2013). Além disso, mutantes na região sensor 1 e sensor 2 apresentam diminuição no recrutamento de MCM2-7 para origem e falhas na dimerização deste hexâmero. Levando ao carregamento de um simples hexâmero para origem, o que é insuficiente para ativação eficiente da replicação (EVRIN et al., 2013). A substituição das argininas da região sensor 2 por glutamato em ScOrc1 diminuiu a hidrólise do ATP na presença e na ausência do DNA específico de origem. No entanto, preservou a capacidade de ligação ao ATP, diminuindo o carregamento de MCM2-7 à origem e afetando a progressão da fase S do ciclo celular (TAKEHARA et al., 2008).

1.4.1 Montagem do CPR e o papel da ligação e hidrólise do ATP nesse contexto

A montagem do CPR e atuação do ATP e sua hidrólise ocorre da seguinte maneira: A interação de ORC ao DNA depende da interação de ORC ao ATP (figura 12).

Figura 12- Representação esquemática da montagem do CPR, incluindo o papel do ATP e sua hidrólise



A figura demonstra a importância do ATP e sua hidrólise para montagem do CPR. A ligação de ORC (azul escuro) á origem é dependente de sua interação com o ATP (azul claro). Posteriormente, a hidrólise de ATP por Cdc6 (verde) é importante para estabilizar sua interação com ORC e recrutar o duplo hexâmero MCM2-7 para à origem. Quando MCM2-7 está estabilizada na origem, o CPR deve ser dissociado e a hidrólise de ATP por Cdc6 libera Cdt1 (lilás), ORC e Cdc6 de MCM2-7.

A alta atividade de ATPase do complexo ORC impede a interação de ORC com uma sequência inespecífica de DNA. No entanto, na presença de uma origem específica, a atividade de ATPase de ORC é inibida, a conformação do complexo é alterada, a interação ORC-DNA é estabilizada e ORC passa então a interagir com Cdc6 (LEI; TYE, 2001) (figura 12). A interação de ORC-Cdc6 é dependente da interação de Cdc6 com o ATP, e uma vez ligado ao DNA, ORC e Cdc6 interagem com Cdt1, trazendo o complexo MCM2-7 às origens de replicação. Nesse momento, a atividade de

ATPase de Cdc6 é importante para estabilizar a interação ORC-Cdc6-DNA, além de ser necessária para o recrutamento do duplo hexâmero de MCM2-7 (EVRIN et al., 2013). Uma vez que a MCM2-7 está estabilizado no DNA, ORC, Cdc6 e Cdt1 não são mais necessárias. Então, a dissociação destas proteínas é também dependente da atividade de ATPase do complexo ORC- Cdc6 (BELL, 2010; FRIGOLA et al., 2013; TSAKRAKLIDES, 2010). Após a dissociação do CPR a atividade de ATPase de Orc1 pode ser necessária para reativação de ORC , iniciando nova montagem do CPR (figura 12) (EVRIN et al., 2013)

1.4.2 Atividade de ATPase de Orc1/Cdc6 em T.brucei

Pela análise da sequência de Orc1/Cdc6 de *T.brucei* evidenciou-se a presença dos sítios de ligação a ATP/GTP Walker A e Walker B, bem como as regiões sensor 1 e sensor 2 (figura 13). Além disso, foi demonstrado que a proteína recombinante TbOrc1/Cdc6 hidrolisa ATP *in vitro* (GODOY et al., 2009). Entretanto, a importância da ligação e hidrólise de ATP no CPR foi comprovada para diversos organismos, mas nunca em *T.brucei*. Compreender esse processo, além de elucidar parte da biologia desses organismos, pode auxiliar na busca de alvos terapêuticos para as patologias causadas pelos tripanossomas.

Figura 13- Sequência primária de Orc1/Cdc6 de *T.brucei*

```
1   MKRRRDSNGKSIAALRAGVAALSVSSNIASRELTCRDSHVKAILDFLNDKVHPVMQVF   58
59  GMPGTGKTASVNHALALLASSSPAGSKPTAVFLNGYIIQKTSDIYWTLNSHLSKTRLKH  117
118 AENCLPEQCPALIEKRFKQGWGSSTTPLCVIVVDEVDKVLKKHNKAFFRIVDWLSLPYA  176
177 FCKLITISNSMELAADAKTRSRLDITKRLVFEPYSLPELKEIILRRVSHIKPTLFAEKA  235
236 INYLCNQTASHYGDVRRLLQSASSAICGLMMRIEEGYKLPEKHDGLLTVKDVHSVVRQI  294
295 FHDRFVEFIQTIRLPVVFISVAVIAVETARLFRANCEDSRLPIDSLFTATKRAQERFGS  349
350 VFADLHAVTLNYGAYLEIVEMLREVALIDVSVGEERIPVKTVQSLLEATERAHASMLQP  408
409 FQTVVDACKLHDDFGTGICPLFSI  432
```

Elementos conservados importantes para ligação e hidrólise do ATP em *T.brucei.* Destacado em verde os motivos Walker A e Walker B respectivamente, e em amarelo as regiões sensor 1 e sensor 2.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a importância da ligação e da hidrólise de ATP da proteína Orc1/Cdc6 para a formação e estabilidade do complexo de pré-replicação em *T.brucei.*

2.2 Objetivos específicos

- Gerar proteínas recombinantes Orc1/Cdc6 de *T. brucei* mutantes que sejam incapazes de ligar ou de hidrolisar ATP.
- Testar a capacidade destes mutantes de ligar ou hidrolisar ATP *in vitro.*
- Clonar estes mutantes em vetores de expressão para expressão em células de *T. brucei.*
- Avaliar as células expressando Orc1/Cdc6 mutada quanto a (i) estabilidade da interação Orc1/Cdc6-DNA, (ii) capacidade de estabilizar MCM2-7 no DNA e (iii) progressão no ciclo celular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura

As formas procíclicas da cepa 29-13 (WIRTZ; CLAYTON, 1995) que expressam o repressor de tetraciclina e a T7 RNA polimerase foram mantidas a 28 ^{o}C, em meio SDM-79 (tabela 2), contendo 50 µg/mL de Higromicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 15 µg/mL de G418 (Sigma). O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino e 7.5 mg/L de hemina. Ao atingir a concentração de 10^7 células/mL, as células foram diluídas para a concentração final de 10^6 células/mL.

Tabela 2- Componentes do meio SDM-79

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

Continua

Biotina	0,2mg
Hemina 2,5 mg/mL	3mL

Nota: Ajustar o pH para 7.6

3.2 Extração DNA genômico dos parasitas

Para a extração de DNA genômico cerca de 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; 2,5M $LiCl_2$) e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Ao lisado foi adicionado 150 µL de fenol equilibrado com tris 0,1M pH 8,0. A amostra foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugada 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, a amostra foi centrifugada a 20.000 x g por 10 minutos. A fase superior aquosa foi coletada e o DNA presente foi precipitado com o dobro de volume de etanol absoluto gelado. Após centrifugar a 20.000 x g por 10 minutos o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de DNA foi lavado com 500 µL de etanol 70% gelado e novamente centrifugado por 5 minutos a 20.000 x g. O DNA foi ressuspenso em 100 µL de TE 1X (Tris-HCl 10mM; 1mM EDTA; pH8) contendo 20 µg/mL de RNAse A e incubado por 15 minutos a 37 °C.

3.3 Mutagênese de Orc1/Cdc6 de *T.brucei*

As construções com mutagênese em Orc1/Cdc6 de *T. brucei* (TbOrc1/Cdc6) foram realizadas utilizando a técnica conhecida como *Overlap extension,* utilizando reação de PCR (HO et al., 1989; SAMBROOK et al., 1989). Foram realizadas duas mutações independentes em TbOrc1/Cdc6, uma no motivo, Walker A que é o sítio de ligação de ATP e outra na região Sensor 2 aonde está localizado o sítio de hidrólise de ATP. Para obtenção da mutação do resíduo de interação com o ATP, foi necessário alterar os nucleotídeos AAA responsáveis pela codificaço do aminoácido Lisina por ACA responsáveis por codificar Treonina. Este mutante foi denominado TbOrc1/Cdc6K65T. Para a mutação no sítio de hidrólise de ATP as sequências alteradas foram AGA e CGT codificante de arginina por GAA e GAG codificante de ácido glutâmico. Este mutante foi denominado TbOrc1/Cdc6R251,252E. Para a realização da mutagênese, foram desenhados alguns oligonucleotídeos. O primeiro par,

para amplificar a porção 5' do gene era formado por: um oligo *sense* (5'-3') correspondente ao início do gene e um oligo *anti-sense* contendo um novo códon para o aminoácido a ser mutado. O segundo par, para amplificar a porção 3' do gene era formado por: um oligo *sense* contendo a sequência complementar a mutação onde ocorrerá o *overlap* (3'-5') e um oligo *anti-sense*, complementar a porção final do gene. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de mutagênese e suas respectivas temperaturas de anelamento encontram-se descritas na tabela 3.

Tabela 3- Oligonucleotídeos utilizados na mutagênese

Nomenclatura do mutante	Fragmento	Oligonucleotídeos	Tm
TbOrc1/Cdc6R251,252E	**PCR1**	**sense A** GGATCCAAACGAAGGAGGGACAGTAAG **anti-sense B** GTAAAAGCTCTTCCACATCCCCGTAGTGC	50ºC
	PCR2	**sense C** GGGATGTGGAAGAGCTTTTACAATCTGC **anti-sense D** GATCCTTAGAATTTATCGTCGTCATC CTTATAATCTCTCGAAAACAGTGG	55ºC
	PCR3	**sense A** GGATCCAAACGAAGGAGGGACAGTAACG **anti-sense D** GATCCTTAGAATTTATCGTCGTCATC CTTATAATCTCTCGAAAACAGTGG	60ºC
	PCR1	**sense A** GGATCCAATTCACGAGTCATTTTGG **anti-senseB** GCGAGGGCGTGGTTCACTGACGCTGTCGTTCC CGTAC	55ºC

Continua

Continuação

TbOrc1/Cdc6K65T	PCR2	sense C CAGCGTCAGTGAACCACGCCCTCGCTCTT anti- sense D AAGCTTTTAGAATTTATCGTCGTCATCCTTA TAATCAGTTTTGAAGAGTGG	**58ºC**
	PCR3	sense A GGATCCAAACGAAGGAGGGACAGTAACG anti-sense D GATCCTTAGAATTTATCGTCGTCATC CTTATAATCTCTCGAAAACAGTGG	**60ºC**

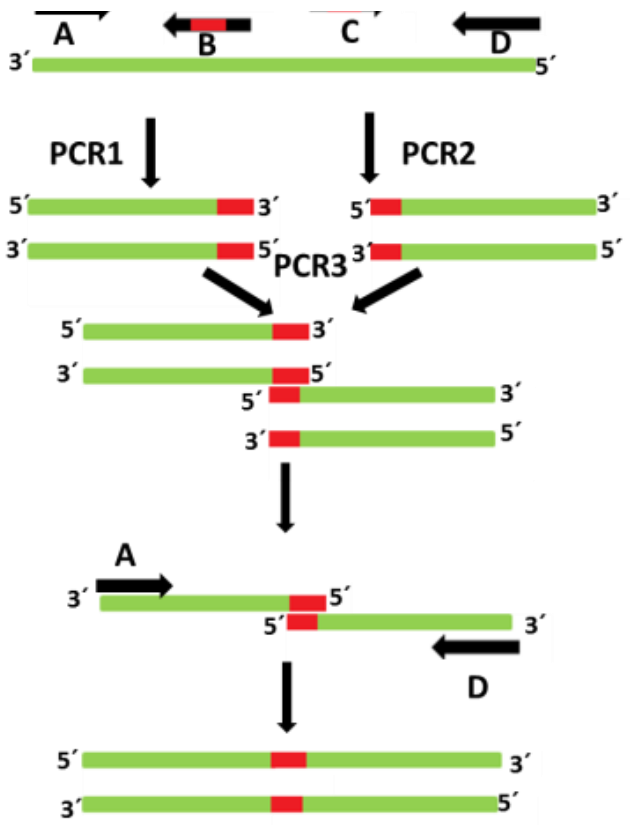
Na tabela estão listados os oligonucleotídeos utilizados para obtenção de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E. Os nucleotídeos destacados em vermelho fazem parte do sítio reconhecido pelas enzimas de restrição *Bam* Hi e *Hind* III, em verde estão os nucleotídeos codificadores do *tag* Flag e em azul os nucleotídeos mutados.

As reações de PCR foram realizadas em três etapas, conforme mostrado na figura 14. Na primeira etapa, chamada de PCR 1 foi utilizado o primeiro par de oligonucleotídeos que insere a mutação desejada (em azul na tabela 3) na porção 5'do gene. Na segunda etapa, chamada de PCR 2, foram realizadas reações que geraram a porção 3'do gene capaz de sobrepor-se a porção 5'do gene. Assim foram obtidos os fragmentos contendo as mutações (produto da PCR 1) e o resto do gene sem mutação (produto da PCR2), cuja sequência se sobrepõe ao produto da PCR1. Nas reações de PCR 1 e 2 foi utilizado como molde DNA genômico *T.brucei.* Para a realização da última etapa de síntese da mutação, chamada de PCR 3, os fragmentos gerados nas duas primeiras etapas foram utilizados como molde. Nessa reação, quantidades equimolares (50ng) dos fragmentos foram adicionadas e utilizou-se oligonucleotídeos *sense* e *anti-sense* que amplificam a sequência completa de TbOrc1/Cdc6. Ao final dessa fase obteve-se os fragmentos contendo a substituição de nucleotídeos na dupla fita de DNA. Além disso, os oligos *anti-sense* utilizados nesta última reação continham a sequência do epitopo *Flag*, portanto, os genes mutados receberam em sua porção 3'

sequência codificadora para epitopo *Flag* (DYKDDDDK) destacados em verde na tabela 3.

As reações de PCR 1 e 2 foram realizadas em volume final de 50 µL, contendo cerca de 100 ng do molde (genômico *T.brucei*) e 10 pmol de cada oligonucleotídeo. O programa utilizado nas reações de PCR foi: 1 ciclo de desnaturação a 95 ºC por 1 minuto; 30 ciclos de anelamento (temperaturas apresentadas na tabela 3); extensão a 68 ºC por 30 segundos; 1 ciclo a 68 ºC por 3 minutos. As reações de PCR 3 também foram realizadas em volume final de 50 µL, contendo aproximadamente 50 ng dos produtos de PCR 1 e 2, 30 pmol de cada oligonucleotídeo, 1 U de *Platinum*® Pfx DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 3 µl de MgCl. O programa utilizado na reação de PCR 3 foi o mesmo utilizado nas reações de PCR 1 e 2, variando apenas a temperatura de anelamento de acordo com os oligonucleotídeos utilizados (tabela 3). Os fragmentos gerados nas reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, coradas com brometo de etídio (0,4 g/mL) e visualizadas por meio de trans - iluminador UV a 302 n

Figura 14- Esquema representativo das etapas para a realização das mutações



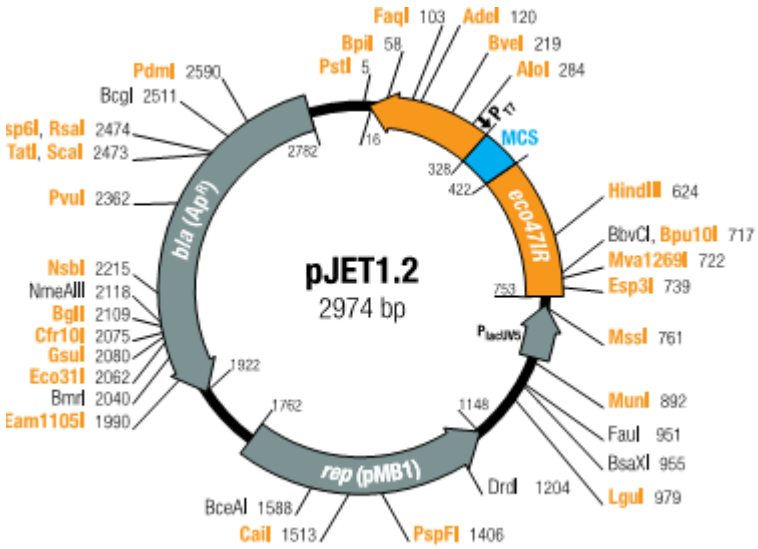
Na reação de PCR1 foram utilizados oligonucleotídeos anti-senso, contendo as substituições dos nucleotídeos, e oligonucleotídeos senso, contendo a seqüência de DNA original. Na reação de PCR 2 foram utilizados oligonucleotídeos senso, contendo as substituições dos nucleotídeos, e oligonucleotídeos anti-senso, contendo a seqüência de DNA original. Na terceira etapa da reação (PCR 3), utilizou-se como molde os fragmentos gerados nas duas reações PCR e oligonucleotídeos senso e anti-senso contendo a sequência de DNA original.

3.4 Clonagem dos genes mutados

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 % e purificados a partir do gel, utilizando o kit *Silica Bead DNA Gel Extraction* (Fermentas St. Leon-Rot, Germany), seguindo instruções do fabricante. Em seguida, 100ng do produto purificado foi utilizado na ligação com o vetor de clonagem pJET 1.2 (figura 15) (*Thermo Scientific*). Foram adicionados à reação de ligação 1µl de DNA Ligase *(*Fermentas), 1µl do buffer da Ligase 10X, e água

milli-Q completando o volume da reação para 10 µl. A reação foi mantida a 4°C durante 16 horas e posteriormente transformada em bactéria *E.coli DH5α*.

Figura 15 – Representação do vetor de clonagem pJET 1.2



Fonte - http://www.thermoscientificbio.com

3.5 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 foi inoculada em 3 mL de LB líquido (com cloranfenicol para *Rosetta* e sem clorafenicol para DH5-α) e incubada por 16 horas a 37 °C sob agitação de 180 rpm. Este pré-inóculo foi adicionado em 250 mL de LB e incubado sob as mesmas condições até atingir DO_{550} 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 (KCl; 50 mM CaCl2.2H2O; 10% glicerol (m/V); 10 mM 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 200µL e estas foram estocadas a -20 °C.

3.6 Transformação em *E. coli*

Bactérias *E. coli* da linhagem *DH5α*, termocompetentes, foram utilizadas. Uma alíquota de 5 µL da reação de ligação contendo o DNA , foi utilizada para transformar 100 µL de bactérias competentes. A amostra foi incubada durante 30 minutos no gelo e em seguida submetida ao choque térmico por meio de incubação a 42 ºC durante 90 segundos, seguida de nova incubação no gelo por 3 minutos. Em seguida foram adicionados 800 µL do meio de cultura LB (constituído por 1% de bactotriptona, 0,5% de bactoextrato de levedura e 1% de NaCl, pH 7,0), previamente autoclavado. A amostra foi mantida a 120 ºC por 20 minutos e a mistura foi incubada sob agitação a 220 rpm, a 37 ºC por 1 hora. Depois, as células foram plaqueadas em meio sólido LB, contendo ampicilina 100 µg/mL e incubadas por 18 h a 37 ºC. A partir das colônias selecionadas foram obtidas mini extrações de DNA plasmidial *(Lise Alcalina)*.

3.7 Extração de DNA plasmidial (*Lise Alcalina*)

Colônias isoladas de *E. coli* foram inoculadas em 3 mL de meio de cultura LB contendo ampicilina (100 µg/mL) a mistura foi incubada sob agitação a 220 rpm, a 37 ºC durante 16 horas. As culturas foram divididas em alíquotas de 1,5 mL e centrifugadas a 20000 x g por 2 minutos a 4 ºC. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso em 100 µl da solução I (10 mM Tris pH8,0 e1mM EDTA pH 8,0). Em seguida, foi adicionado 200 µL da solução II (SDS 1% NaOH e 0,2M) e a amostra foi homogeneizada. Após 3 minutos, 200µL da solução III foi adicionada (NaAc 3 M) e as amostra foram misturadas por inversão e centrifugadas a 20000 xg por 10 minutos. Foi transferido 400 µL do sobrenadante para outro tubo, onde foi adicionado 300 µl de isopropanol e a mistura foi novamente centrifugada a 20000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* lavado com 300 µl de etanol 70% e centrifugado a 20000 xg por 10 minutos. Por fim o *pellet* foi ressuspenso em 30 µl de água Mili-Q com 10 mg/ml de RNAse.

3.8 Digestão com enzimas de restrição

A confirmação da ligação do inserto ao vetor foi feita utilizando as enzimas de restrição *Bam* HI e *Hind* III (inseridas nos oligonucleotídios), onde a reação foi feita utilizando até 1 µg de DNA, seguindo as instruções do fabricante.

3.9 Sequenciamento de nucleotídeos

.Para a reação de PCR, foram misturados 200 ng de DNA, 2 pmol do oligonucleotídeo específico para o vetor (Tabela 4), e foi adicionada água Milli-Q para que o volume final dessa reação fosse de 6µl. Em seguida adicionou-se 3µL do tampão de sequenciamento 2,5x concentrado (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM MgCl2) e 1 µL do *Mix Big DyeTerminator* resultando no volume final de 10 µL. A reação foi incubada em termociclador nas seguintes condições: 1- 95 ºC por 5 minutos; 25 ciclos de 96 ºC por 10 segundos, 50 ºC por 5 segundos e 60 ºC por 4 minutos.

Após a reação de PCR, as amostras foram precipitadas com 80 µL de isopropanol 75%, misturadas vigorosamente e incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos. Após centrifugação a 20000 x g por 25 minutos, o *pellet* foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente por 5 minutos. O *pellet* foi seco por centrifugação a vácuo e ressuspenso em 20 µL de formamida. As amostras foram desnaturadas a 95 ºC por 5 minutos e, após resfriamento durante 1 minuto no gelo, foram transferidas para os tubos apropriados do sequenciador.

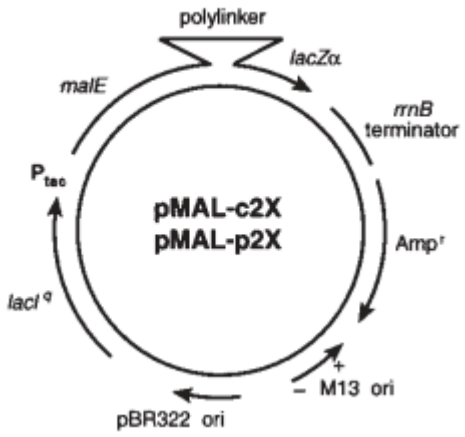
Tabela 4- Oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento

Primer	**Sequência 5'- 3'**
pJET 1.2 forward Seq	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET 1.2 reverse sequencing primer	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

3.10 Subclonagem e expressão no vetor de pMAL c2X

As construções de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E feitas no pJET 1.2 e sequenciadas foram subclonadas no vetor pMAL c2x (Figura 16) e transformadas em bactérias de expressão da cepa *Bl21 rosetta*. Para a expressão da proteína recombinante, um pré-inóculo de 50 mL de LB contendo cloranfenicol (34 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL) e a bactéria *E. coli* BL21 *rosetta* contendo o plasmídeo de expressão foi incubado *overnight* a 37 ºC sob agitação de 200 rpm. Este pré-inóculo foi colocado em 450 mL de LB (para volume final de 500 mL) contendo os antibióticos acima citados e incubados por 2,5 horas a 37 ºC sob agitação de 180 rpm. Em seguida, foi adicionado 1mM de IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside - Sigma) e incubado novamente por mais 3 horas para indução da proteína recombinante. As bactérias induzidas com IPTG foramcentrifugadas por 10 minutos a 7000 x g e o *pellet* foi ressuspenso em 30 mL de tampão da coluna de amilose (20 mM tris-HCl pH 7,4; 200 mM NaCl e 1mM EDTA) contendo inibidores de protease (*EDTA-free Cφmplete protease inhibitor cocktail* da Roche). As bactérias em suspensão foram lisadas sob pressão de 1500 psi (*pounds per square inch*) em *FRENCH Pressure Cell Press* por três vezes sempre mantidas em gelo. O lisado foi centrifugado a 18000 x g por 30 minutos e o sobrenadante contendo a proteína solúvel foi sumetido a coluna de amilose para purificação da proteína recombinante.

Figura 16- Representação do vetor de expressão em *E.coli* pMAL-c2X



Fonte - (Riggs et al., 2013)

3.11 Purificação por afinidade de rTbOrc1/Cdc6R251,252E e rTbOrc1/Cdc6K65T em coluna de amilose

Em uma coluna de vidro foi adicionada 1mL de resina de amilose (*New England Biolabs*) que foi equilibrada com 5 volumes do tampão coluna da resina (20 mM tris-HCl pH 7,4; 200 mM NaCl; 1mM EDTA). Em seguida foi adicionado à coluna 10 mL do sobrenadante do lisado de bactérias contendo rTbOrc1/Cdc6R251,252E ou rTbOrc1/Cdc6K65T, que passaram pela resina apenas sob força da gravidade. O *flow-through* que saiu da resina foi reintroduzido por mais 4 vezes 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.

3.12 Eletroforese de proteínas em gel SDS-Poliacrilamida

O preparo do gel de poliacrilamida contendo SDS (dodecil sulfato de sódio)foi realizado segundo Laemmli (1970). As amostras aplicadas foram submetidas à desnaturação e redução em tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, contendo 2-mercaptoetanol 2% e SDS 2%, aquecidas a 95 ºC durante 5 minutos e aplicadas em volume máximo de 30 µl sobre o gel. Como tampão de corrida foi utilizado Tris-HCl 0,025 M, contendo glicina 0,18 M, pH 8,3 e SDS 1%. As corridas foram desenvolvidas a temperatura ambiente a 150V e a duração foi de aproximadamente 2 horas.

A coloração das bandas de proteínas foi feita com solução de azul de Coomassie R-350 (GE Healthcare), contendo 0,2% do corante em metanol 40% e ácido acético 10%. O gel de SDS-Poliacrilamida foi submerso nesta solução por 10 minutos e descorado com solução de metanol 40% e ácido acético 10% para posterior visualização das bandas protéicas.

.

3.13 Western Blotting

As amostras de proteínas submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE 7,5% foram transferidas para membrana de nitrocelulose (*Amersham Hybond™ ECL™* - GE HealthCare), sob 200V por 50 minutos. Para imunodetecção das proteínas recombinantes foi utilizado como anticorpo primário o Anti-Flag (Sigma). Como anticorpo secundário foi utilizado anti-IgG de *mouse* conjugado com peroxidase (Sigma).

A membrana foi corada com solução de *Ponceau* para visualização das bandas protéicas; logo após, a membrana foi lavada com água Milli-Q para retirada de excesso de corante e incubada em *PBS* (*phosphate buffered saline*) com 5% de leite em pó Molico por 1 hora a temperatura ambiente para bloquear interações inespecíficas entre o anticorpo e a membrana. Após lavagem com *PBS*, a membrana foi incubada por 1 hora com o anticorpo primário (tabela 4) em *PSB*/Tween-20 0,1%. O excesso de anticorpo na membrana foi removido com três lavagens durante 10 minutos cada com *PBS*/Tween-20 0,1% e em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG (tabela 5) marcado com peroxidase por 1 hora. Novamente a membrana foi submetida a lavagens sucessivas com *PBS*/Tween-20 0,1% e então revelada utilizando o Kit de quimioluminescência *(Millipore - RiOs™, Billerica, MA, EUA)* seguindo as indicações do fabricante.

Tabela 5- Anticorpos primários utilizados

Anticorpo Anti:	Diluição	Organismo de Origem	Fonte
TcMcm7	1:100	Coelho	Proteimax
Flag M2	1:5000	Camundongo	Sigma
eIF5A	1:20000	Coelho	(Chung et al. 2013)
Histona H3	1:2000	Coelho	Abcam

3.14 Atividade de ligação ao nucleotídeo ATP

Para confirmar a perda da capacidade de rTbOrc1/Cdc6K65T se ligar ao ATP, foi feito um ensaio em coluna de ATP-agarose (Sigma). A resina de ATP-agarose foi equilibrada com o tampão A (50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM

EDTA, 0.2 mM PMSF, 0.5 M KCl, 0.2 M NaCl, 5 mM MgCl2) e cerca de 10 µg de proteína recombinante foi adicionada à coluna. O *flow-through* que saiu da resina foi novamente introduzido na coluna por mais 4 vezes. Todo o procedimento foi executado em câmara fria para evitar a degradação do ATP acoplado à matriz. A resina foi lavada com 20 volumes do Buffer A e a eluição das proteínas ligantes de ATP foi feita com o buffer A acrescido de 10 mM de ATP. As frações eluídas foram analisadas em gel SDS-PAGE e corado com Comassie Blue.

3.15 Atividade de ATPase

A hidrólise de ATP foi medida pelo fosfato inorgânico liberado por meio de um método colorimétrico (FISKE; SUBBAROW, 1925). Em tubos de 1.5 mL foram adicionados 1 µg de proteína recombinante, diferentes concentrações de ATP (2-15 mM) e o tampão para uma concentração final de 50mM de Tris-HCl pH 8, 1 mM de $MgCl_2$. A reação foi completada com água Mili-Q para o volume de 250µL e incubada a 37ºC por 30 minutos. A reação foi interrompida com TCA (ácido tricloro acético) 15%, mantida no gelo por 10 minutos, e então centrifugada a 1000 x g por 10 minutos. Para revelação foi utilizado 125 µL do sobrenadante, que foi transferido para uma placa de ELISA e acrescido de 63 µL de solução reveladora (molibidato de amônio 1% e 180 mM de sulfato ferroso). O fosfato inorgânico liberado foi quantificado no comprimento de onda de 660 nm.

3.16 Predição estrutural de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E

A sequência de TbOrc1/Cdc6 (Tb11.02.5110) foi submetida a uma plataforma de modelagem online que gera modelos de estrutura tridimensional por meio de múltiplos alinhamentos e simulação de montagem estrutural, a plataforma é denominada MUFOLD (ZHANG J et al., 2010) . O programa identificou o modelo estrutural do heterodímero cristalizado Cdc6/Orc1 de *sulfolobus solfactaricus* (2QBY) como *template* mais adequado para a predição e a partir deste modelo foram geradas as modelagens de TbOrc1/Cdcd6, TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E. Foi possível

comparar as estruturas e principais domínios de modo a inferir o impacto das mutações na estrutura de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E.

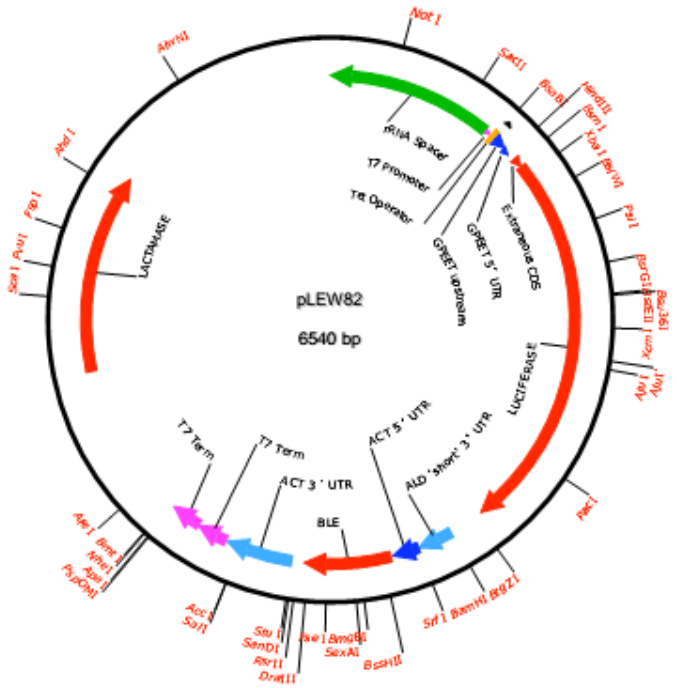
3.17 Construção no pLew82

Após confirmar a perda da atividade de ligação de ATP de TbOrc1/Cdc6K65T e de ATPase de TbOrc1/Cdc6R251,252E *in vitro* , foi analisado o impacto dessas mutações para viabilidade das células de *T.brucei*. Para isso, o gene de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E *clonado no pJET 2.1* foi utilizado como molde de uma reação de PCR, utilizando os oligonucleotideos apresentados na tabela 6. O produto de PCR foi clonado do pJET 2.1 e subclonado no vetor de expressão em *T.brucei* pLew82 (figura 17) e transformado em bactérias competentes DH5α. Após confirmar a clonagem dos respectivos insertos no vetor, foi efetuada uma extração de DNA plasmidial em grande escala, utilizando o Kit *Maxi Prep* (Quiagen). Para efetuar a extração, colônias isoladas foram inoculadas em meio LB contendo 100 µg/mL de Ampicilina e a mistura foi incubada sob agitação a 220 rpm, a 37 ºC durante 16 horas. Após esse período a cultura foi expandida para 500 mL de LB com ampicilina e incubada sob agitação a 220 rpm, a 37 ºC durante por mais 16 horas, em seguida realizou-se a extração do DNA plasmidial seguindo as instruções do fabricante do Kit. Foi obtido cerca de 100 µg de DNA por extração e 30 µg foi linearizado com a enzima *Not I* em seguida o DNA linearizado foi precipitado com 2 volumes de etanol e ao final do processo o DNA foi reidratado com água Mili-Q estéril, quantificado e 10 µg foi utilizado para a transfecção.

Tabela 6 - Oligonucleotídeos usados na construção dos mutantes para o pLew82

Sequência de Oligonucleotídeo	Temperatura de Anelamento
5AAGCTTAAACGAAGGAGGGACAGTAACG	**60°C**
5' GGATCC TTAGAATTTATCGTCGTCATC CTTATAATCTCTCGAAAACAGTGG	

Figura 17 – Representação do vetor de expressão para células de *T.brucei*



3.18 Transfecção nas formas procíclicas de *T. brucei*

Para efetuar a transfecção dos genes TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E em células procíclicas da cepa 29.13 de *T.brucei* foi utilizado em cada transfecção $2.5X10^7$ de parasitas em fase exponencial.

As células foram centrifugadas a 2000x g a 4 ºC por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado e armazenado em geladeira (meio condicionado), as células foram lavadas com tampão de transfecção *Cytomix* (tabela 7) e centrifugadas por mais 10 minutos a 4º C.

Tabela 7- Componentes do tampão *Cytomix*

Componente	**Massa**
EGTA pH 7.6	2 mM
KCl	120 mM
CaCl	0.15 mM
K2HPO4/KH2PO4 pH 7.6	10 mM
HEPES pH 7	25 mM
MgCl2.6H2O	5 mM
Glucose (Dextrose)	0.5%
BSA	100 µg/ml
Hypoxanthine	1 mM

Nota: Ajustar o pH para 7.6

O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 400 µL do mesmo tampão e delicadamente adicionadas a cubeta de 0.4 mm pré-resfriada. Em seguida, 10 µg do DNA foi adicionado á cubeta e deixado no gelo por 5 minutos antes da eletroporação. A eletroporação seguiu os seguintes parâmetros: 2 pulsos de 1.6kV e 25 µF intercalados com 1 minuto em gelo. Após a eletroporação, o conteúdo foi transferido para garrafa de cultura contendo 5 mL de meio SDM-79 acrescido de 50 µg/mL de Higromicina ,15 µg/mL de G418 e 5 mL de meio condicionado. Após cerca de 16 horas foi adicionado à garrafa 5 µg/mL de Fleomicina (Sigma), para a seleção dos transfectantes e transferiu-se 5mL desta garrafa para uma placa de 24 poços, a fim de isolar clones dos parasitas transfectados .Na primeira linha da placa foi adicionado 1mL do conteúdo da garrafa por poço. Nas demais linhas 0.5 mL de meio condicionado contendo 50 µg/mL de Higromicina, 15 µg/mL G418 e 5 µg/mL de Fleomicina. Transferiu-se 0.5 mL do poço da primeira linha para o poço logo abaixo, da segunda linha. O conteúdo foi homogeneizado e transferido para o terceiro e assim sucessivamente, realizando uma diluição seriada de ordem dois. As placas

foram vedadas com plástico, armazenadas em câmara úmida e incubadas na estufa a 28 ºC.

3.19 Indução da expressão de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E e curva de crescimento

Após a seleção dos transfectados com os genes TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E e a obtenção de cerca de 10^7 células/mL destes transfectados efetuou-se a indução da expressão dos genes. Para isso, 10 mL de cultura (~10^8 de parasitas) foram divididos em duas garrafas de cultura e acrescidos 16mL de meio SDM-79 contendo 50 µg/mL de Higromicina, 15 µg/mL G418 e 5 µg/mL de Fleomicina em cada garrafa, obtendo-se assim 2 garrafas com 20 mL de cultura cada. Umas das garrafas foi identificada como "+Tet", na qual foi adicionada Tetraciclina, que é o indutor da expressão dos genes transfectados, em uma concentração final de 4 µg/ml. A outra garrafa foi identificada como "Tet", pois nesta o indutor não foi adicionado e os parasitas desta garrafa foram utilizados como controle negativo. A concentração das células foi mensurada por contagem em câmara de Neubauer e cerca de $2X10^7$ com e sem Tetraciclina foram coletadas em intervalos 24 horas. Para as curvas de crescimento, a concentração de células das culturas com e sem Tetraciclina foi determinada e plotada em função do tempo.

3.20 Citometria de Fluxo

Para a fixação, 10^6 células da forma procíclica de *Trypanosoma brucei* foram mantidas a 4 ^oC por pelo menos 4h ou até *overnight* em 1 mL de metanol 70%/PBS1x 30% gelado e fresco.

Após a 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 10 mg/mL de iodeto de propídeo. Estas células foram incubadas por 30 minutos a 37 ^oC e em seguida foram feitas as leituras no aparelho FACs BD Callibur conforme os parâmetros na tabela 8.

Tabela 8 – Parâmetros utilizados para análise do ciclo celular de *Trypanosoma brucei* no aparelho FACs BD Callibur.

Parâmetro	Detector	Voltagem	AmpGai	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

3.21 Extrato Diferencial

10^8 células foram ressuspensas em 100 µL de tampão de extração (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 300 mM sacarose; 3 mM $MgCl_2$; 50 mM NaF; 1mM Na_3VO_4; 0,5 mM PMSF; 0,1% Triton X-100 e coquetel de inibidores de protease – Roche) (GODOY et al., 2009) e incubadas no gelo por 10 minutos, em seguida foram centrifugadas a 10000 x g por 10 minutos a 4 ^oC. O sobrenadante foi recolhido como fração I de proteínas solúveis. Ao *pellet* foi novamente adicionado 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 100 µL de tampão 1X para enzima DNAase I contendo 50 unidades desta (Fermentas) e incubado por 30 minutos a 37 ^oC. Após centrifugação o sobrenadante foi recolhido como fração I de proteínas ligadas ao DNA e o *pellet* foi novamente ressuspenso em 100 µL 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.

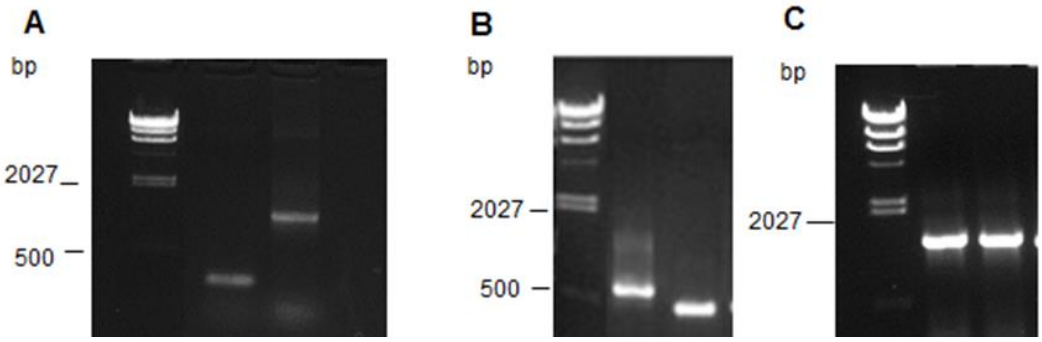
4 RESULTADOS

4.1 Mutagênese sítio dirigida da proteína TbOrc1/Cdc6

A atividade de ligação e hidrólise de ATP pelos componentes do complexo de pré-replicação é fundamental para a montagem do complexo em regiões específicas dos cromossomos. As moléculas envolvidas no complexo de pré-replicação de tripanosomas diferem das presentes no complexo dos demais eucariontes. No entanto, Orc1/Cdc6 também apresenta capacidade de interação com ATP e atividade de ATPase. Assim, decidimos investigar o papel do ATP na montagem do complexo de pré-replicação. Para tanto, foram realizados experimentos de mutação sítio-dirigida. Foram feitas duas mutações independentes em Orc1/Cdc6 de *T.brucei* (TbOrc1/Cdc6). A primeira, no sítio de ligação ao ATP Walker A (figura 7), onde a lisina 65 foi substituída por uma treonina. Este mutante foi denominado TbOrc1/Cdc6K65T. A segunda mutação foi realizada na região sensor 2, responsável pela hidrólise do ATP, nesta região foram feitas substituições: as argininas 251 e 252 por ácido glutâmico. Este mutante foi denominado TbOrc1/Cdc6R251,252E.

As construções com mutagênese sítio dirigida foram realizadas por meio de três reações de PCR para cada mutante gerado. Na reação de PCR 1 foi gerada a porção 5' do gene contendo a mutação desejada. Na segunda etapa da reação de PCR (PCR 2), foi gerada a porção 3' do gene contendo uma região capaz de sobrepor ao produto da PCR1. Para TbOrc1/Cdc6K65T obteve-se um fragmento de 240bp na PCR1 e 1070bp na PCR2 (figura 18 A). E em TbOrc1/Cdc6R251,252E o fragmento obtido na PCR 1 foi de 765bp e 566 na PCR 2 (Figura 18 B). Na etapa final da construção dos mutantes (PCR 3), foram gerados os fragmentos completos de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E contendo as substituição de nucleotídeos nos códons selecionados para mutação. Nessa etapa o produto obtido de ambos os mutantes foi de 1310bp, equivalente a sequência completa de TbOrc1/Cdc6 (figura 18 C).

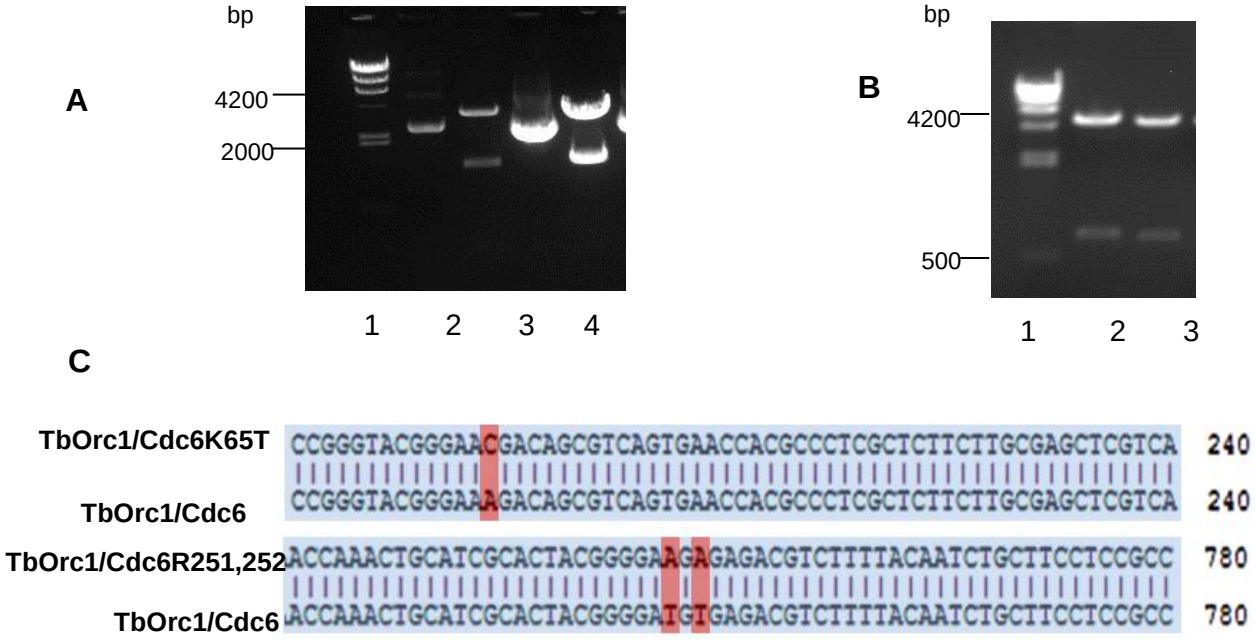
Figura 18- *Overlap* PCR para obtenção dos fragmentos de DNA contendo as mutações em TbOrc1/Cdc6. bp



A. os produtos obtidos em PCR para geração do mutante TbOrc1/Cdc6K65T. Na linha P o padrão de DNA λ *Hind* III, na linha 1 o produto da PCR 1 e na linha 2 o produto da PCR 2. B. os produtos obtidos em PCR para geração do mutante TbOrc1/Cdc6R251,252E. Na linha P o padrão de DNA λ *Hind* III, na linha 1 o produto da PCR 1 e na linha 2 o produto da PCR 2. C. os produtos obtidos após a PCR 3, em P o padrão de DNA λ *Hind* II, em 1 e 2 os fragmentos completos de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E, respectivamente.

Os produtos de PCR contendo suas respectivas mutações, foram ligados ao vetor de clonagem pJET1.2. Os clones positivos quanto a presença de DNA foram digeridos com enzimas de restrição (*Bam* HI e *Hind* III) e a ligação foi confirmada pela presença de duas bandas de DNA, uma com massa molecular correspondente ao inserto (~1300bp) e a outra ao vetor (~3000bp) (figura 19 A). Após confirmar a obtenção dos fragmentos mutados por meio de sequenciamento (19 C), estes foram retirados do vetor pJET por meio de digestão com *Bam* HI e *Hind* III (figura 19 B) e subclonados no vetor pMAL c2x, que permite a fusão do gene de interesse a MBP (*maltose binding protein*). A MBP é exportada para o periplasma, logo a fusão de proteínas à MBP auxilia na obtenção de proteína solúvel, e na purificação desta em coluna de amilose (Riggs et al., 2013). Em seguida os clones positivos quanto à presença de DNA foram digeridos com enzimas de restrição (*Bam* HI e *Hind* III) e a ligação foi confirmada pela presença de duas bandas, uma com massa molecular correspondente ao inserto (~1300bp) e a outra ao vetor (~6000bp) (figura 19 B).

Figura 19- Clonagem e sequenciamento de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E



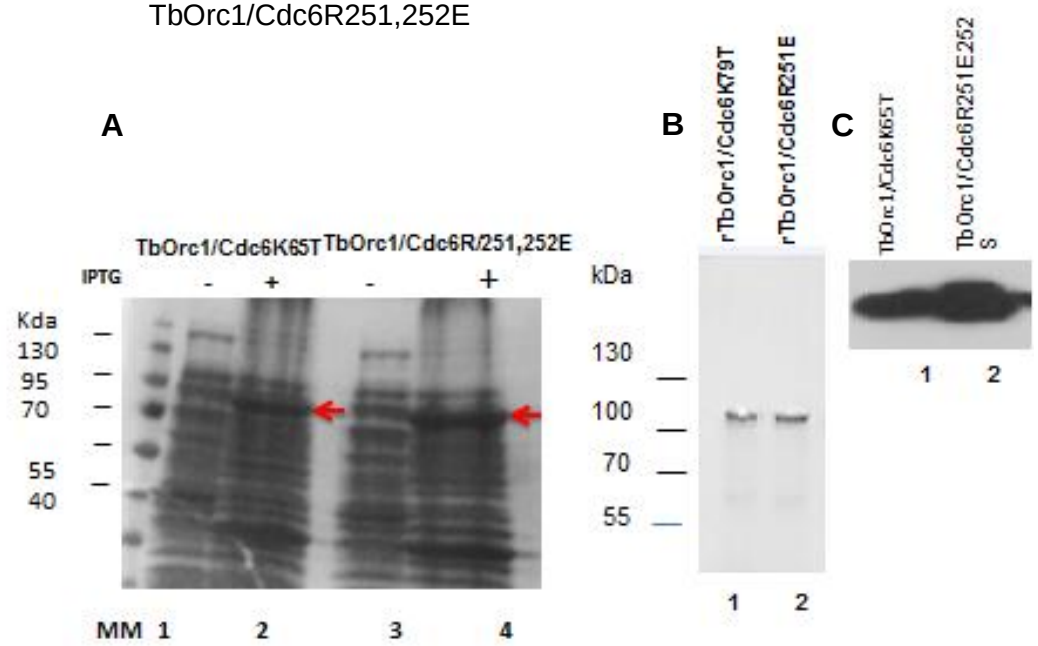
A. as construções obtidas dos genes mutados foram digeridas com *Bam* HI e *Hind* III (+). O produto de cada digestão foi submetido a gel de agarose ao lado de uma construção não linearizada (-). Na linha P λ Hind III, linha 1 e 2 construção de TbOrc1/Cdc6K65T e linha 3 e 4 construção de TbOrc1/Cdc6R251,252E. B. subclonagem dos fragmentos mutados no vetor pMALC2x. Na linha P λ *Hind* III, linha 1 TbOrc1/Cdc6K65T e linha 2 TbOrc1/Cdc6R251,252E digeridos com *Bam* HI e *Hind* III. C. Alinhamento da sequência primária de TbOrc1/Cdc6 com as sequências obtidas por sequenciamento de Tborc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E. Destacados em vermelho estão os nucleotídeos mutados.

4.2 Obtenção da Proteína recombinante TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E

Após efetuar a indução da expressão de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E, submeteu-se o extrato celular das bactérias induzidas e não induzidas, de modo a compará-las em gel SDS-page (figura 20 A). Os extratos celulares que apresentaram expressão das proteínas recombinantes foram submetidos à lise mecânica em *french press* seguido de purificação das proteínas recombinantes em coluna de amilose (figura 20 B). Além disso, os extratos celulares com expressão protéica induzida foram submetidos a *western blotting* utilizando anti-Flag com o intuito de testar a expressão do *tag* Flag inserido na sequência dos oligonucleotídeos utilizados

para gerar os mutantes. Todos os mutantes foram expressos com *tag*, o que será essencial durante os ensaios *in vivo* para a discriminação entre TbOrc1/Cdc6 nativa e as mutadas (figura 20 C).

Figura 20- Expressão e purificação de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E



.

A. extrato total *de E.coli Rosetta* antes e depois da indução da expressão protéica com IPTG. Nas linhas 1 e 3 estão os extratos de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251R252E antes de serem induzidos, respectivamente. Nas linhas 2 e 4 os mesmos após indução com IPTG. B rTbOrc1/Cdc6K65T (linha1) e rTbOrc1/Cdc6R251ER252S (linha 2) foram purificadas em coluna de amilose. O produto obtido foi submetido a SDS-PAGE e corado com comassie blue. C. o extrato celular de bactérias expressando Tborc1/Cdc6K65T ou TbOrc1/Cdc6R251.252E, foi transferido para membrana de nitrocelulose e foi feito *western blotting* com o anticorpo anti-Flag (Sigma).

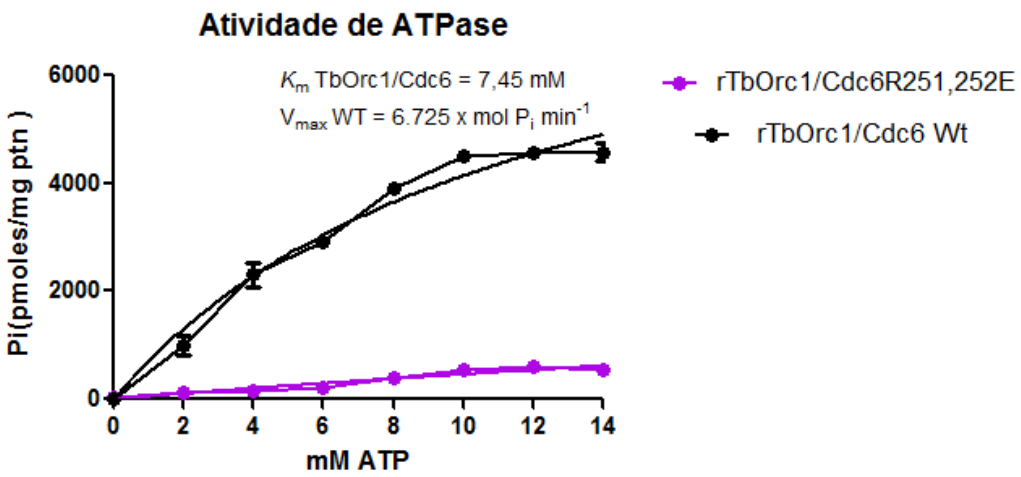
4.3 Caracterização funcional de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E

4.3.1 Ensaio de ATPase de rTbOrc1/Cdc6R251,252E

Após obtenção da proteína recombinante contendo a mutação na região sensor 2, considerada essencial para atividade de ATPase, efetuou-se um ensaio funcional com o intuito de confirmar a perda de função desta região. Para isso, foi utilizado o método colorimétrico de Fiske e Subbarouw, no qual é possível medir a quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado durante a

hidrólise do ATP. Como esperado, o ensaio mostrou que o mutante r TbOrc1/Cdc6R251,252E teve sua capacidade de hidrolisar ATP reduzida de forma significativa (figura 21).

Figura 21- Ensaio de Atividade de ATPase de TbOrc1/Cdc6R251,252E

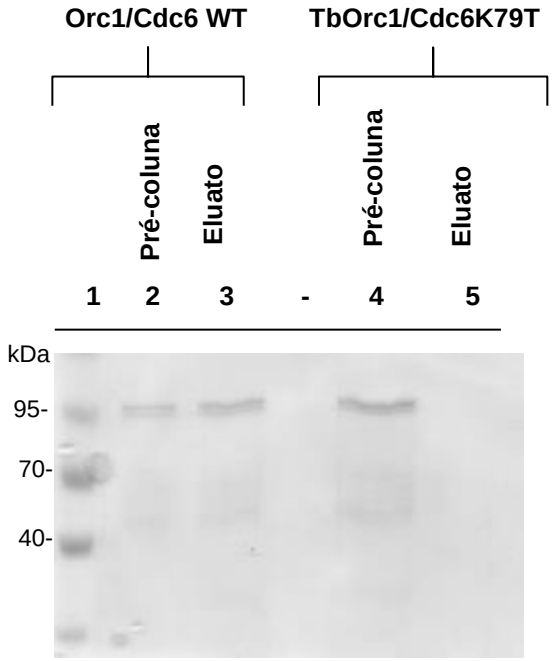


As proteínas purificadas rTborc1/Cdc6 Wt (preto), e rTbOrc1/Cdc6R251,252E (roxo) foram incubadas em diferentes concentrações de ATP, e a quantidade de Pi liberada foi quantificada usando o método de Fiske e Subarow modificado.

4.3.2 Ensaio de ligação de rTbOrc1/Cdc6K65T ao ATP

Para confirmar a perda da capacidade de rTbOrc1/Cdc6K65T de ligar-se ao ATP, foi feito um ensaio de cromatografia de afinidade em coluna ATP-agarose. Nesse ensaio, a proteína recombinante purificada foi introduzida na coluna de ATP, e eluída com um *buffer* também contendo ATP, de modo a competir com a proteína ligada ao ATP imobilizado na coluna. O mesmo foi feito com Tborc1/Cdc6 selvagem (TbOrc1/Cdc6 Wt). O produto da eluição foi analisado em gel SDS-page 10%. Devido a ausência de rTbOrc1/Cdc6K65T nas frações eluídas, diferente de TbOrc1/Cdc6, foi possível confirmar que rTbOrc1/Cdc6K65T perdeu sua capacidade de se ligar ao ATP (figura 22).

Figura 22- Ensaio de ligação de ATP de rTbOrc1/Cdc6K65T



As proteínas purificadas TbOrc1/Cdc6K79T e TbOrc1/Cdc6 Wt foram submetidas à cromatografia de afinidade em coluna de ATP-agarose. Na linha 1 tem-se o padrão de massa molecular, na linha 2 e 4 estão as frações de TbOrc1/Cdc6 Wt e TbOrc1/Cdc6K65T coletadas antes de serem introduzidas na coluna

4.3.3 Modelagens moleculares de TbOrc1/Cdc6, TbOrc1/Cdc6K65T TbOrc1/Cdc6R251,252E

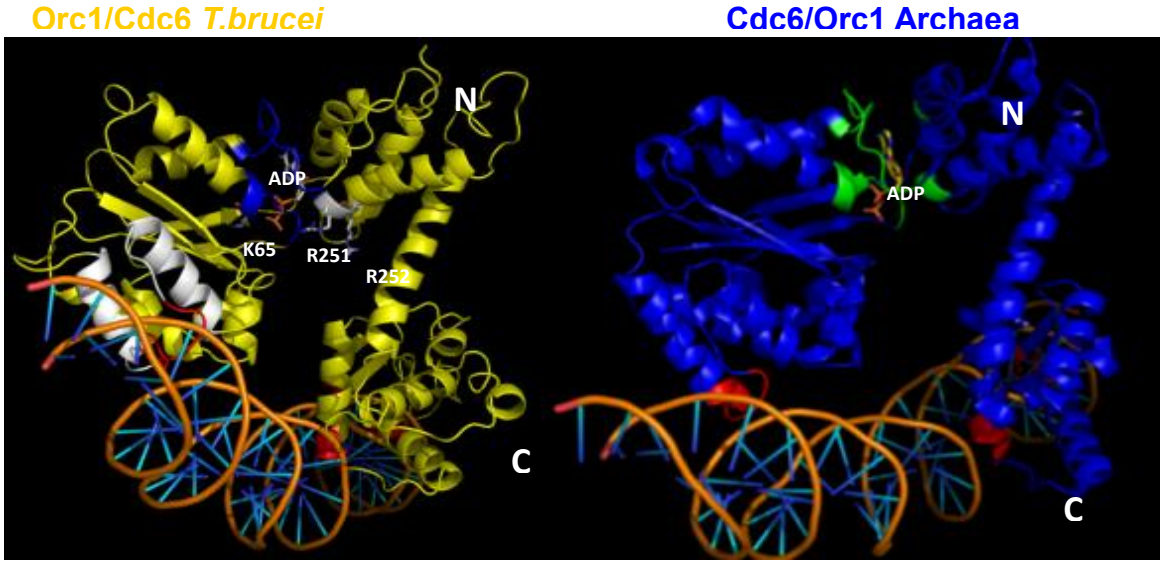
Para avaliar o impacto das mutações na estrutura terciária de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E, as sequências destas proteínas bem como a sequência de TbOrc1/Cdc6 foram submetidas a uma plataforma online, denominada MUFOLD. Esta plataforma efetua múltiplos alinhamentos com as sequências cristalizadas presente no banco de dados. A estrutura cristalizada, identificada pelo MUFOLD com a maior similaridade foi a do heterodímero Cdc6/Orc1 de uma espécie de Archaea, *Sulfolobus solfataricus* (2QBY). Primeiramente foi feita a modelagem de TbOrc1/Cdc6 e comparada com Cdc6/Orc1 de Archaea (figura 23 A), que foi cristalizada na presença de ADP e ligada ao DNA. A estrutura de Cdc6/Orc1 de Archaea possui forma de ferradura e sua estabilidade no DNA depende da ligação do ADP. Quando há ADP ou ATP no sítio da proteína, esta adquire a rigidez

necessária e então os domínios de interação com o DNA podem permanecer ligados ao DNA. Ao comparar TbOrc1Cdc6 com Cdc6/Orc1 de *Archaea*, foi evidenciada a semelhança estrutural mediante a presença dos motivos de interação ao ATP na região N- terminal, bem como os dois domínios de interação com o DNA.

Também foram gerados modelos com a predição da estrutura de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E e comparados com TbOrc1/Cdc6. O efeito das mutações na perda de interação com ATP ou hidrólise do mesmo fica perceptível na estrutura de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E. O ATP se acomoda em uma cavidade negativa no extremo superior (para ligar o ADP/ATP) e positiva na parte inferior para ligar os fosfatos (figura 23 B). Mutar a lisina, que é grande e positiva, por um resíduo curto e negativo como a treonina pode mudar a afinidade do ATP pelo sítio nessa região (figura 23 C). E mutar duas argininas, que são grandes e positivas, por um resíduo negativo como o glutamato pode mudar a natureza do sítio que abriga os fosfatos, sem desestruturá-lo, o que pode manter íntegra sua capacidade de ligar o ATP (figura 23 D).

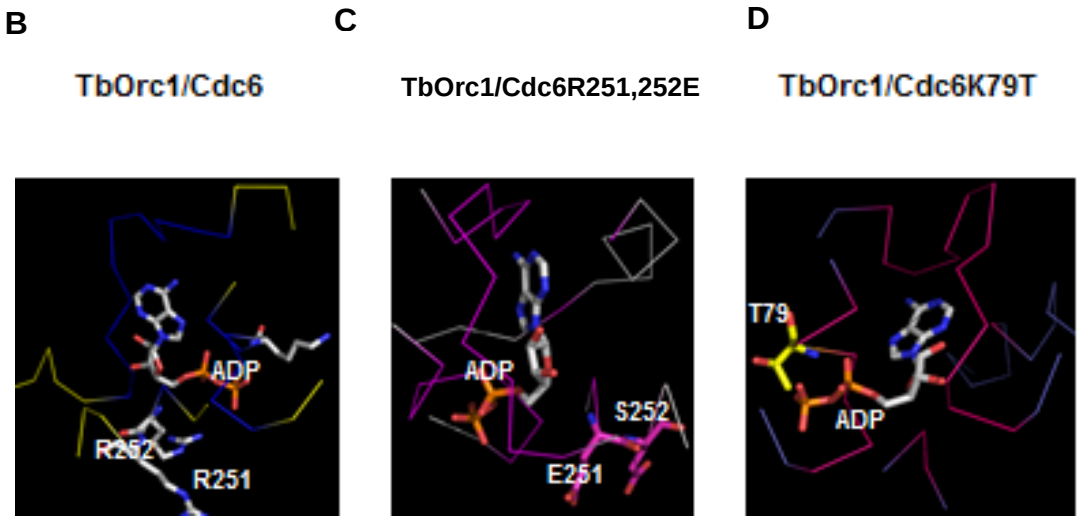
Figura 23- Modelagens moleculares de TbOrc1/Cdc6, TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E

A



Continua

Continuação



As sequências de aminoácidos das proteínas TbOrc1/Cdc6 TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E foram submetidas à plataforma online MUFOLD para obtenção dos modelos das estruturas tridimensionais. Em A tem-se a comparação estrutural de TbOrc1/Cdc6 com Cdc6/Orc1 de Archaea. No modelo de TbOrc1/Cdc6 (amarelo) estão destacados os principais domínios, em azul o sítio de interação com o ATP e em vermelho os domínios de interação com o DNA. Além disso, a localização dos aminoácidos mutados está indicada. Em Cdc6/Orc1 de Archaea (azul) está destacado em verde o sítio de interação ao ATP e em vermelho de interação com o DNA. Em B, C e D tem-se uma ampliação apenas da onde foram efetuadas as mutações. B. está a estrutura do sítio de ADP/ATP de TbOrc1/Cdc6, o ADP (laranja) interage com os aminoácidos do sítio. C. os aminoácidos substituídos estão marcados, e não interagem com outros aminoácidos do sítio. D. a lisina mostra-se fundamental para interação do ATP com o sítio, pois a substituição pela treonina (amarela) alterou a estrutura do sítio de ATP.

4.4 Caracterização do papel da ligação e da hidrólise do ATP de Orc1/Cdc6 em células de *T.brucei*

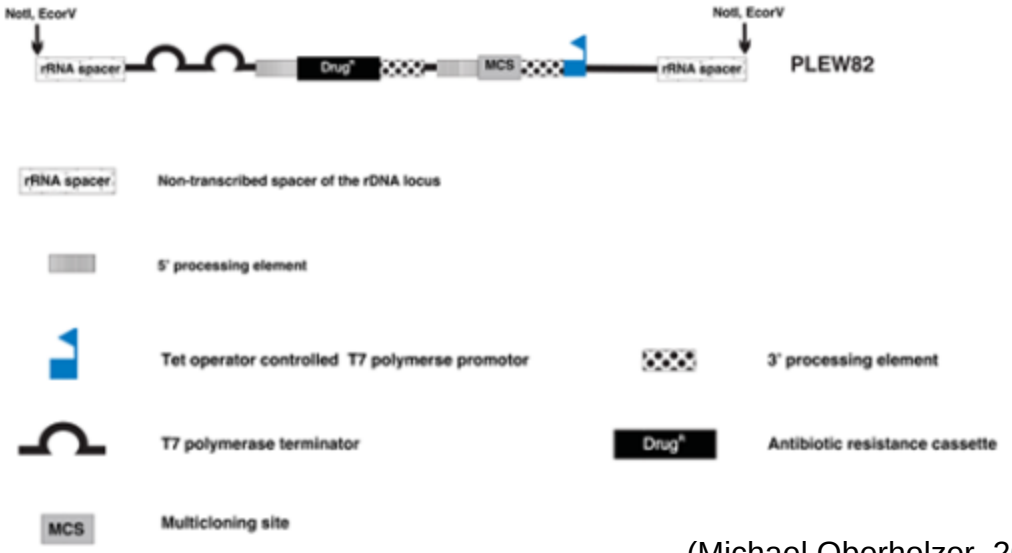
4.4.1 Clonagem de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E em vetores de expressão em células de T. brucei

Uma vez confirmada a perda da capacidade de ligação de ATP e hidrólise de ATP das proteínas TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E, respectivamente, estes genes foram clonados em um sistema de expressão estável. Este sistema é constituído pela linhagem celular de *T.brucei* 29-13, derivada da forma procíclica 427 que expressa constitutivamente a T7RNA polimerase e o repressor da tetraciclina (TetR), e pelo vetor de expressão induzível por tetraciclina o pLew82 (Wirtz et al., 1999). Neste vetor a sequência do gene de interesse é regulada pelo promotor T7 e pela região operadora de tetraciclina (Otet). O pLew82 integra-se nas regiões.

A. clonagem dos fragmentos mutados no vetor de expressão em células de *T.brucei* pLew82. Os clones positivos quanto a presença do DNA foram submetidos à digestão com *Bam* HI e *Hind* III e a ligação foi confirmada pela presença de duas bandas com massa molecular correspondente ao esperado. Na linha P λ *Hind* III, linha 1 TbOrc1/Cdc6K65T e linha 2 TbOrc1/Cdc6R251,252E. B. uma representação esquemática do processo de transfecção. O vetor pLew82 contendo resistência a Fleomicina (vermelho) e ampicilina (azul) ligado ao gene TbOrc1/Cdc6K65T ou TbOrc1/Cdc6R251,252E (amarelo) fundido ao *tag* Flag (verde) em sua porção 3' é inserido nas células de *T.brucei* por meio de eletroporação.

espaçadoras de rDNA (DNA ribossômico) (figura 24). Assim, as células de *T.brucei* 29-13 foram transfectadas com os plasmídeos contendo TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E e a expressão foi modulada pela adição de tetraciclina no meio de cultura.

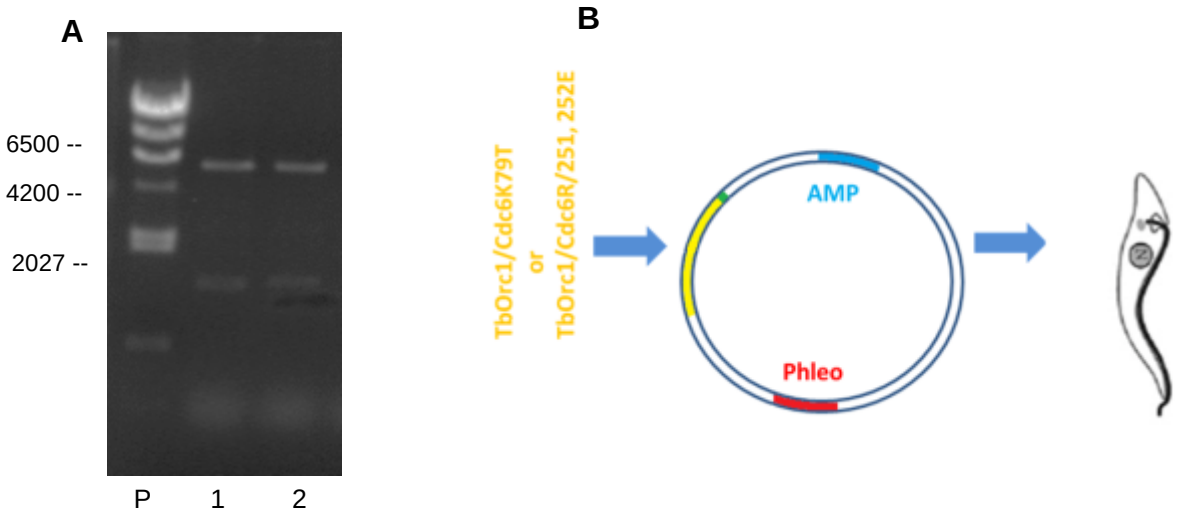
Figura 24- Cassete de expressão pLew82



(Michael Oberholzer, 2009)

Os genes TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E foram clonados no vetor pLew82 e digeridos com *Bam* HI e *Hind* III e a ligação foi confirmada pela presença de duas bandas de DNA, uma com massa molecular correspondente ao inserto (~1300bp) e a outra ao vetor (~6000bp) (figura 25 A)

Figura 25- Clonagem e transfecção de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E para expressão em *T.brucei*



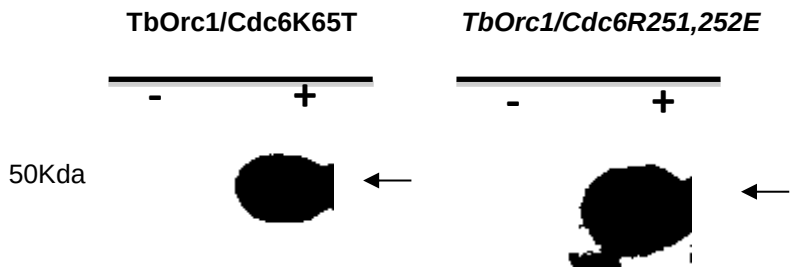
4.4.2 Transfecção de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E em células de T.brucei

Confirmada a clonagem dos genes no vetor de expressão em *T.brucei,* as bactérias contendo os clones positivos foram inoculados em grande volume de LB (~500mL) para obtenção de altas concentrações de DNA que foi utilizado na transfecção. A extração pasmídial foi efetuada, o DNA foi quantificado e em seguida digerido com a enzima *Not* I para linearizar os plasmídios e permitir a recombinação para que os plasmídios integrem-se no genoma de *T.brucei.* Após a eletroporação os clones que apresentaram crescimento em meio seletivo foram testados quanto à expressão dos genes transfectados.

4.4.3 Indução da expressão de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E

Após 24 horas na presença de tetraciclina, o extrato total dos parasitas foi submetido a ensaio de *western blotting* com o anti-Flag para identificar a expressão das proteínas mutadas, fundidas este *tag.* O anticorpo reconheceu apenas uma banda na altura de massa molecular esperada (50KDa) nos extratos das linhagens TbOrc1/Cdc6K65T e em TbOrc1/Cdc6R251,252E tratadas com tetraciclina. As amostras mantidas na ausência de tetraciclina, indicando que realmente TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E foram expressos em células de *T.brucei* (figura 26).

Figura 26 - *Western blotting* da expressão de TbOrc1/Cdc6K65T e *TbOrc1/Cdc6R251,252E* em células de *T.brucei*

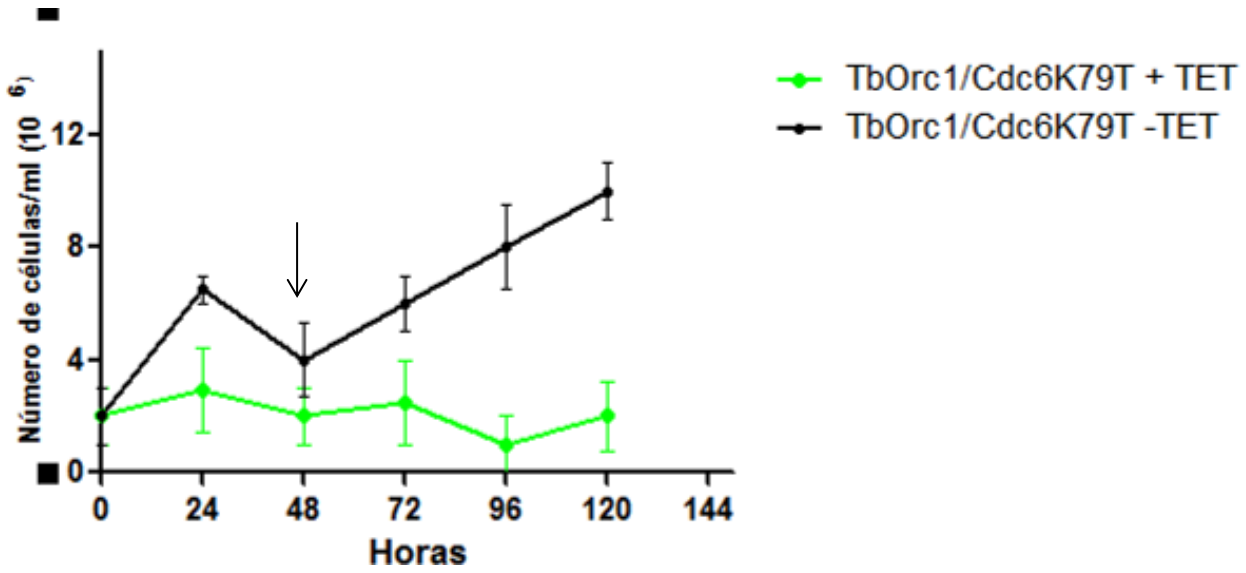


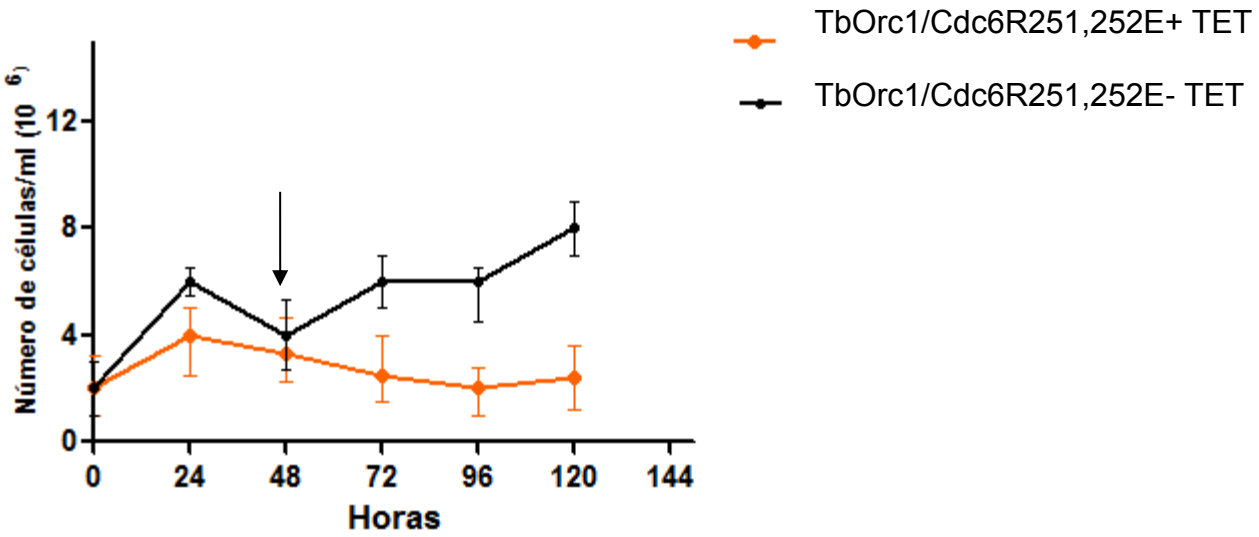
O extrato total de *T.brucei* contendo os genes transfectados Tborc1/Cdc6K65T, TbOrc1/Cdc6R251,252E antes (-) e após (+) a indução com tetraciclina foram transferidos para membrana de nitrocelulose e incubados com o anticorpo anti-Flag.

4.4.4 Curva de crescimento celular

Após identificar os clones que apresentaram a transfecção estável e com nível de expressão detectável, foi avaliado o impacto da ausência da ligação de ATP ou hidrólise de ATP de TbOrc1/Cdc6 no crescimento das células de *T.brucei.* Para isso procedimento de indução da expressão, já citado, foi efetuado. Quando as células adquiriram a concentração de $1x10^7$ o conteúdo da garrafa foi distribuído igualmente em duas garrafas de modo que em cada uma tivesse a concentração de $2x10^6$ células/mL e em uma garrafa foi adicionado 4µg/mL de tetraciclina (+Tet) e a outra garrafa não recebeu o indutor da expressão (-Tet). Em seguida, as células foram contadas a cada 24 horas para monitoramento do crescimento e a média dos resultados obtidos em três experimentos distintos foram plotados em um gráfico (figura 22). Após 48 horas de indução as células foram repicadas e foi dada continuidade a indução. Nas células transfectadas com TbOrc1/Cdc6K65T ou TbOrc1/Cdc6R251,252E observou-se redução acentuada de crescimento quando induzida a expressão do gene mutado (+Tet). Em TbOrc1/Cdc6K65T a redução do crescimento no quinto dia da indução chegou a 80% e em TbOrc1/Cdc6R251,252E a redução foi de cerca de 30% comparado com os seus respectivos controles (-Tet).

Figura 27- Gráfico da curva e crescimento das células expressando TbOrc1/Cdc6K65T ou TbOrc1/Cdc6R251,252E





Células transfectadas TbOrc1/Cdc6K79T (painel superior) e TbOrc1/Cdc6R251,252E (painel inferior) foram tratadas (+Tet) ou não (- Tet) com tetraciclina. Em seguida as células foram contadas a cada 24 horas para monitoramento do crescimento e a média dos resultados obtidos em três experimentos distintos estão apresentados. A seta apontada para o ponto 48 horas nos dois gráficos indicam o dia em que foi realizado o repique.

4.4.5 Extrato diferencial de células de T.brucei expressando TbOrc1/Cdc6K65T ou TbOrc1/Cdc6R251,252E

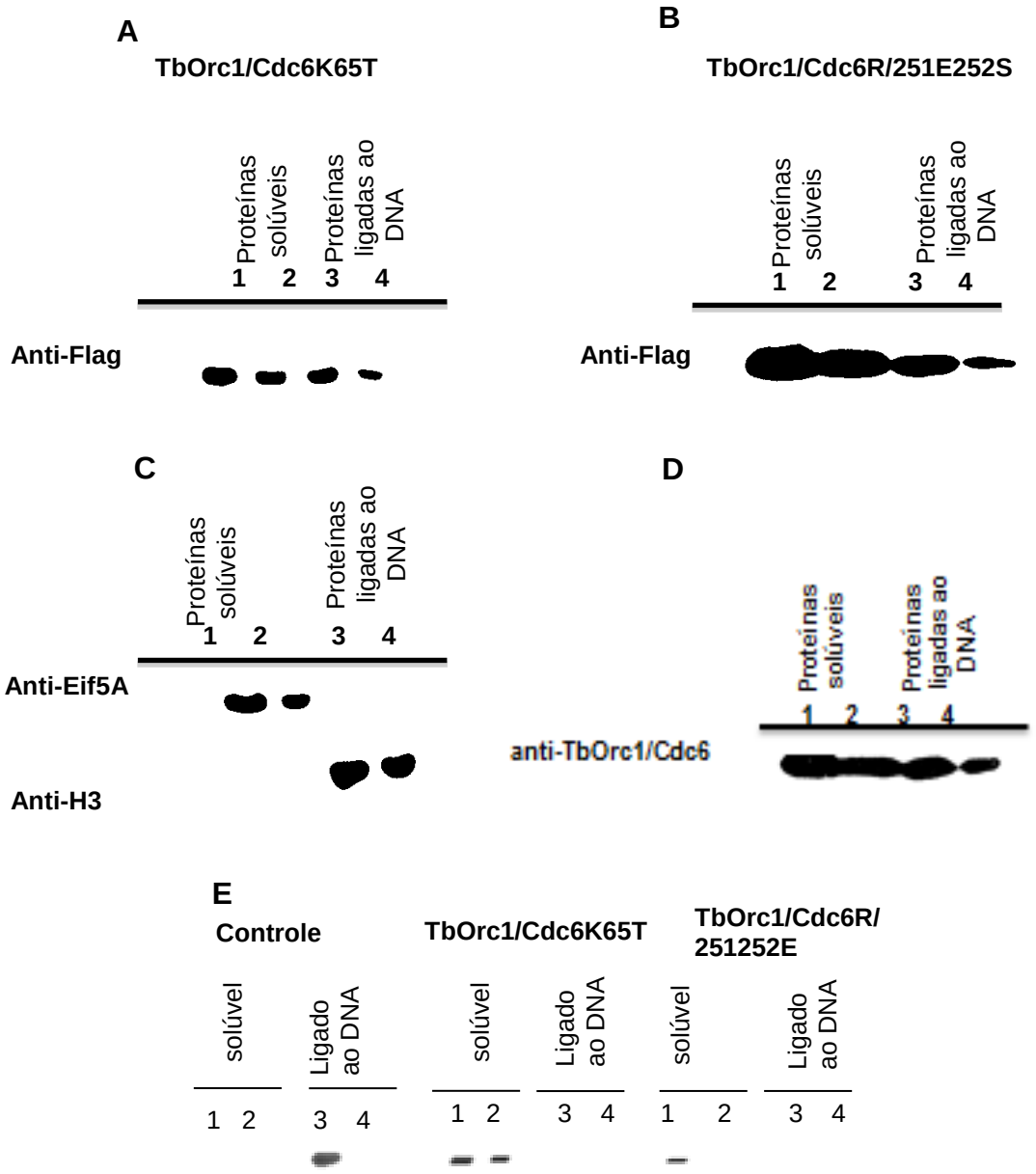
Para caracterizar a interação de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E com o DNA foi feita a extração diferencial de proteínas solúveis e proteínas ligadas ao DNA de células não sincronizadas expressando TbOrc1/Cdc6K65T ou TbOrc1/Cdc6R251,252E. Neste ensaio, as células foram primeiramente tratadas com tampão contendo detergente para extração das proteínas solúveis e posteriormente tratadas com DNAse para solubilizar as proteínas que interagem com DNA. Os extratos foram submetidos a ensaio de *western blotting* utilizando anti-Flag. Em ambas as linhagens analisadas, as proteínas TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E estão presentes tanto na fração solúvel quanto na fração de proteínas ligadas ao DNA, mas em diferentes proporções nessas frações (figura 28 A e B). Como controle de proteínas solúveis utilizou-se anti-eIF5A e como controle de proteínas ligadas ao DNA foi utilizado anti-histona H3. E como esperado, eIF5A está presente somente nas frações de proteínas solúveis (figura 28 C) e histona H3 somente na fração de proteínas ligadas ao DNA (figura 28 C).

Com o intuito de comparar o perfil da distribuição de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E nas frações de proteínas solúveis e nas frações de proteínas ligadas ao DNA, com TbOrc1/Cdc6, o resultado obtido com o anti-Flag foi comparado com resultados prévios obtidos com TbOrc1/Cdc6 (figura 28 D).

Para mensurar a distribuição dessas proteínas nas diferentes frações, a intensidade das bandas exibidas nos experimentos de *western blotting* foi quantificas utilizando o software *Image J*. 64% de TbOrc1/Cdc6K65T expresso está na fração solúvel e apenas os 36% restantes está na fração de proteínas ligadas ao DNA. No mutante TbOrc1/Cdc6R251,252E a concentração de proteína presente na fração de proteínas ligadas ao DNA foi de 33% e na fração solúvel 67%. A proteína TbOrc1/Cdc6 selvagem está distribuída na fração solúvel em uma proporção de 59% e na fração de proteínas ligadas ao DNA 41%.

As membranas contendo extrato diferencial de TbOrc1/Cdc6K65T, TbOrc1/Cdc6R251,252E e Tborc1/Cdc6 também foram incubadas com anti-Mcm7 a fim de avaliar a interação de MCM com o DNA nas células expressando TbOrc1/Cdc6K65T, TbOrc1/Cdc6R251,252E (figura 28 E). A proteína Mcm7 foi detectada no controle apenas na fração de proteínas ligadas ao DNA (linha 3). Em TbOrc1/Cdc6K65T Mcm7 foi detectada apenas nas fração solúvel (linhas 1 e 2). Na linhagem TbOrc1/Cdc6R251,252E, a proteína mutante foi detectada apenas na primeira fração solúvel. Estes resultados indicam uma diferença no carregamento de MCM de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E quando comparados ao controle TbOrc1/Cdc6.

Figura 28- Extrato diferencial de células expressando TbOrc1/Cdc6K65T ou TbOrc1/Cdc6R251,252E

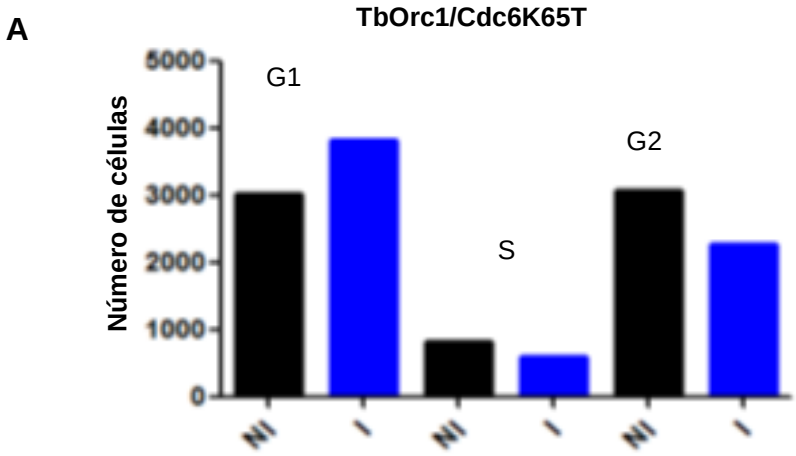


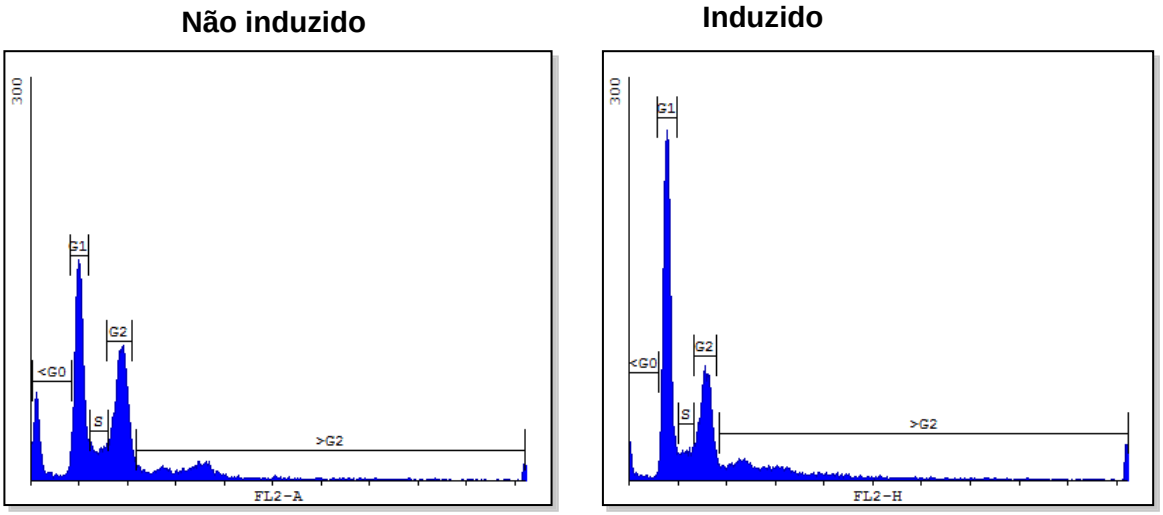
Os *pellets* das células induzidas (+Tet) expressando TbOrc1/Cdc6K65T ou TbOrc1/Cdc6R251,252E foram tratadas com tampão contendo detergente para extração das proteínas solúveis (linhas 1). Os *pellets* foram novamente tratados com o tampão contendo detergente (linhas 2). Em seguida, os *pellets* foram tratados com DNAse e as amostras foram centrifugadas. O sobrenadante foi denominado "fração de proteínas ligadas ao DNA" (linhas 3). Os *pellets* foram novamente tratados com DNAse, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi denominado "fração de proteínas ligadas ao DNA 2" (linhas 2). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE, seguido de *Western blotting* usando anti-flag (A e B), Eif5A (figura C acima), anti-H3 (figura C abaixo). Os resultados obtidos com o anti-flag foram comparados com resultados prévios obtidos com anti-Orc1/Cdc6 também em extrato diferencial. Além disso, as membranas foram incubadas com anti-Mcm7(E).

4.4.6 Citometria de fluxo

O efeito da expressão de TbOrc1/Cdc6K65T ou TbOrc1/Cdc6R251,252E sobre o ciclo celular foi avaliado utilizando a técnica de FACS. Para isso, comparou-se as células induzidas (+Tet) e não induzidas (-Tet) marcadas com iodeto de propídeo. A análise de FACS mostrou que existe diferença entre as células induzidas e não induzidas. Após 48 horas de indução em houve um acúmulo de células na fase G1 do ciclo celular. Tanto em TbOrc1/Cdc6K65T como em TbOrc1/Cdc6R251,252E (figura 29).

Figura 29- Duas representações do gráfico de citometria de fluxo de TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E



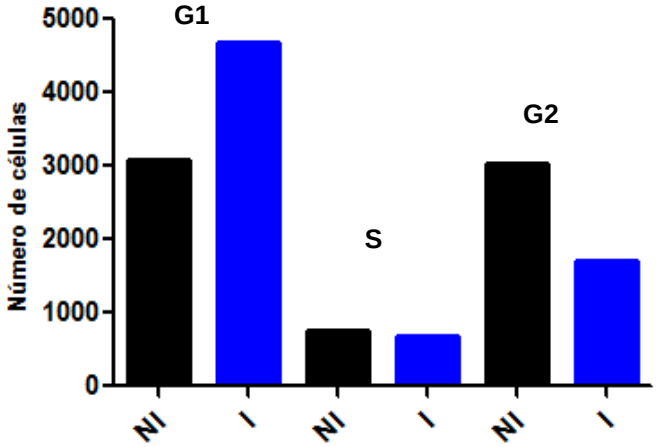


Continua

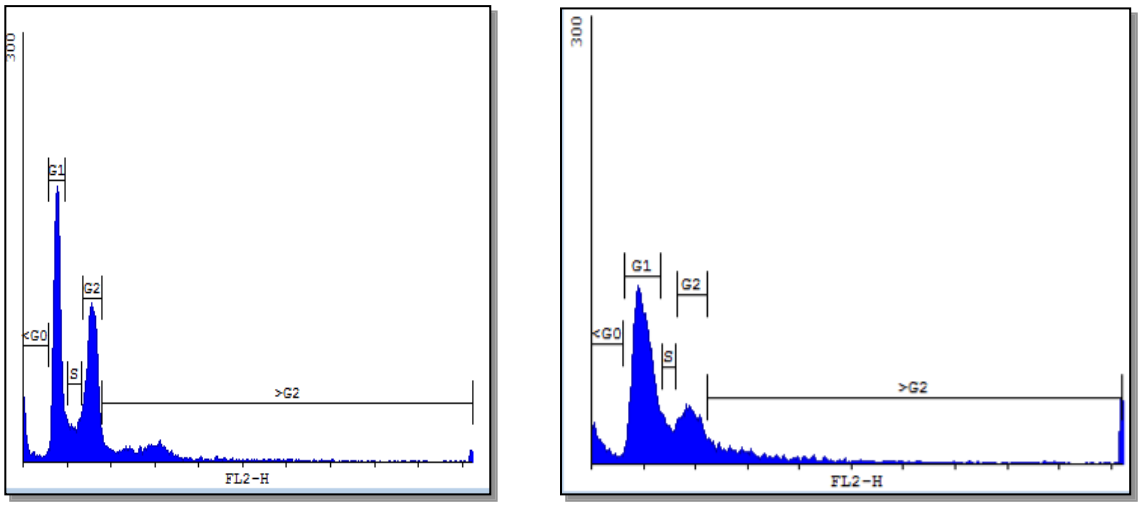
Continuação

TbOrc1/Cdc6R251,252E

B



Não induzido **induzido**



Células de *T.brucei* expressando TbOrc1/Cdc6K65T (A) ou TbOrc1/Cdc6R251,252E (B) coradas com iodeto de propídeo foram separadas pela quantidade de fluorescência emitida. Células induzidas (+Tet) por 48 horas foram comparadas com células não induzidas (-Tet). Painel superior apresenta o gráfico quantitativo do numero de células nas diferentes fases do ciclo celular. Painel inferior apresenta o perfil da intensidade de florescência das células não induzidas (esquerda) ou induzidas com Tetraciclina (direita).

5 DISCUSSÃO

Para caracterização do papel da ligação e hidrólise de ATP por Orc1/Cdc6 de *T.brucei* foram efetuadas mutações independentes, no motivo Walker A e na região Sensor 2.

Após obtenção de rTbOrc1/Cdc6K65T e rTbOrc1/Cdc6R/251E,252 partiu-se para os ensaios funcionais, com o objetivo de confirmar a perda da atividade motivos Walker A e sensor 2. Primeiramente foi efetuado um ensaio para verificar se rTbOrc1/Cdc6R251,252E perdeu a capacidade de hidrolisar o ATP. Nesse ensaio, houve uma redução expressiva da concentração de fosfato inorgânico liberado por rTbOrc1/Cdc6R251,252E em comparação com rTbOrc1/Cdc6 (figura 21). Este resultado sugere que a região sensor 2 é importante para a atividade de ATPase de TbOrc1/Cdc6 e que, assim como em leveduras e bactérias, as argininas desta região são essenciais para o funcionamento da região sensor 2. Em leveduras, as argininas da região sensor 2 de Orc1 são responsáveis por reconhecer os grupos fosfatos do ATP, que está ligado no motivo Walker A, e promover a hidrólise deste ATP (TAKEHARA et al., 2008). Por esse motivo, os mutantes desta região são capazes de se ligar ao ATP, mas não de hidrolisá-lo, o que explica a ausência de hidrólise de ATP por rTbOrc1/Cdc6R251,252E .

Para avaliar a capacidade de rTbOrc1/Cdc6K65T ligar-se ao ATP, foi feito um ensaio funcional que mostrou ausência de rTbOrc1/Cdc6K65T nas frações eluídas da coluna de ATP- agarose. Esse dado confirma sua incapacidade de interagir com o ATP (figura 22), demonstrando a importância da Lisina 65 do motivo Walker A para que ocorra efetiva interação de TbOrc1/Cdc6 ao ATP.

Efetuamos também modelagem computacional por homologia de modo a se obter um vislumbre da estrutura tridimensional das proteínas TbOrc1/Cdc6, TbOrc1/Cdc6K65T e TbOrc1/Cdc6R251,252E. Por meio de modelagem foi possível inferir a importância do ATP para a estrutura de TbOrc1/Cdc6 (figura 23 A). Já foi relatado previamente que Orc1 e Cdc6 alteram sua estrutura ao se conjugar ao ATP. O modelo evidencia que o

ATP/ADP fornece a rigidez necessária para que a estrutura em forma de ferradura de TbOrc1/Cdc6 possa se ligar ao DNA. Sem o ATP/ADP TbOrc1/Cdc6 possui uma estrutura frouxa o que torna sua interação com o DNA inexistente ou instável. O mesmo é observado para a necessidade de interação de Orc1 de leveduras com o heteroátomo de ATP (DUEBER et al., 2007; SPECK et al., 2005).

As análises dos modelos explicam os ensaios funcionais, pois a disposição dos aminoácidos substituídos justifica a perda de função destas proteínas. A substituição da lisina 65, que é um aminoácido grande e positivo, pela treonina, que é um resíduo menor e negativo, impactou na afinidade do sitio de interação com o ATP (figura 23 B). Em estudos prévios essa lisina mostrou interação direta com os fosfatos do ATP, sendo essencial para a função desse motivo (GOMEZ et al., 2002). A estrutura tridimensional do mutante rTbOrc1/Cdc6R251,252E também acrescentou informações a respeito da influência da substituição de duas argininas da região sensor 2 na estrutura de TbOrc1/Cdc6. A interação das argininas conservadas desse motivo com os fosfatos do ATP promovem sua hidrólise. As substituições desses resíduos tornaram esse motivo incapaz de interagir com o ATP. Entretanto, o ATP pode permanecer ligado ao sítio mesmo que não possa ser hidrolisado, pois sua estrutura permaneceu íntegra (figura 23 C).

Análise do papel destes mutantes *in vivo* mostrou que ambos os mutantes apresentam interação com DNA, assim como a proteína selvagem (figura 28). Como descrito acima, a interação de Orc1/Cdc6 com ATP deveria ser essencial para interação desta com DNA. Neste sentido, esperaríamos observar TbOrc1/Cdc6R251,252E associado ao DNA, mas não TbOrc1/Cdc6K65T. No entanto, o mutante TbOrc1/Cdc6K65T também estava associado com o DNA. Esse dado pode indicar que a ligação de Orc1/Cdc6 ao ATP é dispensável para sua interação com o DNA, contradizendo o modelo proposto. Como em Archaea Cdc6/Orc1 forma um trímero na origem de replicação (DUEBER et al., 2007), é possível que o mesmo esteja ocorrendo em *T. brucei* e as proteínas mutantes estejam interagindo com as endógenas selvagens para associar-se ao DNA. Esta hipótese está sendo avaliada em nosso laboratório. Se confirmado, este resultado reforçará a ideia que o CPR de tripanosomas trabalha de fato como em Archaea, com

um trimero composto por apenas uma subunidade homóloga tanto a Orc1 quanto a Cdc6. Isto excluiria a hipótese proposta na literatura (TIENGWE et al., 2012; TIENGWE et al., 2014) que o CPR de tripanosmas é composto por um heterohexâmero ORC, que apresenta Orc1/Cdc6 como uma das subunidades.

Tanto o mutante TbOrc1/Cdc6K65T, quanto o mutante TbOrc1/Cdc6R251,252E não foram capazes de recrutar Mcm7 para o DNA. Como o heterohexâmero de MCM é formado antes da interação com DNA (Evrin et al., 2009) a falta da Mcm7 no DNA é suficiente para inferir que o complexo MCM não é funcional nestes mutantes. Como o mutante que não liga ATP também não é capaz de hidrolisá-lo e como os fenótipos de ambos os mutantes são iguais, concluímos que o fenótipo observado, com a ausência de MCM no DNA, seja devido a ausência da hidrólise de ATP por Orc1/Cdc6. Assim, concluímos que esta hidrólise é necessária para o recrutamento de MCM na origem de replicação. Em leveduras, a atividade de ATPase do complexo ORC-Cdc6 faz com que o complexo MCM inicialmente associado a ORC-Cdc6, solte-se destas proteínas e circule o DNA, ficando fortemente associado ao material genético e pronto para iniciar a replicação (BELL, 2013; EVRIN et al., 2013; FRIGOLA et al., 2013, 2013; SAMSON). Em nosso ensaio de extrato diferencial, não é possível inferir se a Mcm7 encontrada na fração solúvel estava de fato desassociada de Orc1/Cdc6 ou ligada a Orc1/Cdc6, mas não interagindo diretamente com DNA. De qualquer maneira, podemos concluir que, assim como em leveduras, a atividade de ATPase de Orc1/Cdc6 é necessária para uma resistente interação MCM-DNA.

Em leveduras, o carregamento ineficiente de MCM2-7 para a origem de replicação ocasiona atraso na fase S do ciclo celular (TAKEHARA et al., 2008). De forma a avaliar esse efeito nas células expressando TbOrc1/Cdc6R251,252E ou TbOrc1/Cdc6K65T, foi feita análise de citometria de fluxo nessas células. Tanto em TbOrc1/Cdc6R251,252E ou TbOrc1/Cdc6K65T foi evidenciado um acumulo de células na fase G1 do ciclo celular, gerando um atraso da fase S. Atraso ocasionado, muito provavelmente, devido a falhas no carregamento de MCM2-7. Esse resultado, somado as dados do carregamento de MCM2-7, indica que a ligação e/ou

hidrólise de ATP são indispensáveis para o recrutamento das helicases MCM2-7 bem como para a progressão do ciclo celular.

Diante de todos os resultados obtidos, a importância da hidrólise e ligação do ATP para a estabilidade do CPR em *T.brucei* ficou clara. Acreditamos que a falta da ligação de ATP ou falta da hidrólise afeta de formas diferentes o CPR. Nossa hipótese é que a ligação de TbOrc1/Cdc6 ao DNA é dependente de ATP. Já a hidrólise do ATP é requerida em outro momento. Nossos dados levam-nos a propor que TbOrc1/Cdc6 deve hidrolisar ATP para recrutar MCM2-7 para a origem CPR.

Em um estudo prévio, nosso grupo identificou Orc1/Cdc6 como membro do complexo de pré-replicação de *T.brucei* e *T.cruzi* (GODOY et al., 2009). Orc1/Cdc6 é uma proteína fundamental para replicação em tripanosomas, sendo estruturalmente diferente das proteínas eucarióticas. Neste trabalho, identificamos e caracterizamos os motivos importantes desta proteína e que, quando comprometidos, prejudicam a proliferação celular do *T. brucei*. Esses dados contribuem para o entendimento da fisiologia do CPR. Mais que isto, devem ser explorados na tão necessária busca por novos alvos terapêuticos, que atuem de forma efetiva no tratamento da Doença do sono.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho caracterizamos os motivos importantes para a atividade de ligação de ATP e hidrólise de Orc1/Cdc6 de *T.brucei*. Além disso, mostramos a importância da atividade de ligação e hidrólise de ATP de TbOrc1/Cdc6 para a estabilidade do complexo de pré-replicação, bem como para a progressão do ciclo celular e proliferação. Esses dados não só trazem importantes informações sobre a biologia replicava em *T.brucei*, mas também evidenciam um possível alvo molecular que pode ser empregado na produção de fármacos mais específicos e eficientes no tratamento da doença do sono.

*REFERÊNCIAS**

ARAVIN, D.L.; KOONIN, E.V .DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. **Nucleic Acids Res**., V. 27, p. 4658-4670, 1999

ARDELL, D.H.B.C. Department of Cell and Molecular Biology, Uppsala University, Uppsala, Sweden, L. A. Kirsebom, and B. C. Department of Cell and Molecular Biology, Uppsala University, Uppsala, Sweden. The Genomic Pattern of tDNA Operon Expression in E. coli. **PLOS Computational Biology 1**, 2005.

BELL, S.P; A. DUTTA. DNA replication in eukaryotic cells. A**nnu. Rev Biochem.** , v. 71, p. 333-374, 2002

BELL, S.P.; B. Stillman. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. **Nature** . v. 357, p.128-134, 1992

BENMERZOUGA, I.; J. CONCEPCIÓN-ACEVEDO, H. S; KIM, A; V. VANDOROS; G. A., CROSS; M. M., KLINGBEIL; B. LI. Trypanosoma brucei Orc1 is essential for nuclear DNA replication and affects both VSG silencing and VSG switching. **Mol Microbiol.,** v. 87 p.196-210, 2013.

BOWERS, J.; J. RANDELL; S. CHEN; S. BELL. ATP hydrolysis by ORC catalyzes reiterative Mcm2-7 assembly at a defined origin of replication. Molecular Cell., v. 16 p. 967-978, 2004.

BRINGAUD, F; E. GHEDIN; N. M. EL-SAYED; B. PAPADOPOULOU. Role of transposable elements in trypanosomatids. **Microbes Infect.,** v. 10 p.575-581, 2008.

CHONG, J. P.; M. K. HAYASHI; M. N. SIMON; R. M. XU; B. STILLMAN. A double-hexamer archaeal minichromosome maintenance protein is an ATP-dependent DNA helicase. **Proc Natl Acad Sci U S A**., v. 97 p.1530-1535, 2000.

CHUNG, J.; A. A. ROCHA; R. R. TONELLI; B. A. CASTILHO; S. SCHENKMAN. Eukaryotic initiation factor 5A dephosphorylation is required for translational arrest in stationary phase cells. **Biochem J.,** v. 451 p.257-267, 2013.

COSTA, A.; HOOD IV.; BERGER JM. Mechanisms for initiating cellular DNA replication. **Annual review of biochemistry.**, v.82 p. 25-54, 2013.

COSTA, A.; ONESTI S. Structural biology of MCM helicases. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**., v. 44950 p.326-342, 2009

DANG, H. Q.; Z., LI. 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.,** v. 286 p.32424-32435, 2011.

DE, FELICE; M.L., ESPOSITO; M. ROSSI; F.M. PISANI. Biochemical characterization of two Cdc6/ORC1-like proteins from the crenarchaeon Sulfolobus solfataricus. **Extremophiles.,** v.10 p.61-70, 2006.

DE, PAMPHILIS, M.L. Eukaryotic DNA replication: anatomy of an origin. A**nnu Rev Biochem.,** p.62:29-63, 1993.

DUEBER, E; L.C CORN J.E; BELL, S. D; BERGER J.M. Replication origin recognition and deformation by a heterodimeric archaeal Orc1 complex. **Science**., v. 317p. 1210-1213, 2007.

DUNCKER, BP; CHESNOKOV LN; MCCONKEY BJ. The origin recognition complex protein family. **Genome Biol**., v. 10 p.214, 2009

EVRIN, C; A. FERNANDEZ-CID; J. ZECH; M.C., HERRERA; A. RIERA; P. CLARKE; S., BRILL ; R.,LURZ; C. SPECK. In the absence of ATPase activity, pre-RC formation is blocked prior to MCM2-7 hexamer dimerization. **Nucleic Acids Res**., v. 41 p.3162-3172, 2013.

FISKE, C.H.; Y., SUBBAROW. The colorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**., v.66 p.375-400.

FORSBURG, SL. Eukaryotic MCM proteins: Beyond replication initiation. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**., v. 68 p. 109-131 2004

FRIGOLA, J; REMUS, D; MEHANNA, A.; DIFFLEY, J. F. ATPase-dependent quality control of DNA replication origin licensing. **Nature.**, v. 495 p.339-343, 2013.

GARTENBERG, M.R. The Sir proteins of Saccharomyces cerevisiae: mediators of transcriptional silencing and much more. **Curr Opin Microbiol.**, v. 3 p.132-137, 2000.

GEISSENHONER, A; C. WEISE; A. E. EHRENHOFER-MURRAY. Dependence of ORC silencing function on NatA-mediated Nalpha acetylation in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol., v. 24 p.10300-10312, 2004.

GIORDANO-COLTART, J. C; Y. YING; J. GAUTIER; J. ,HURWITZ. Studies of the properties of human origin recognition complex and its Walker A motif mutants. **Proc Natl Acad Sci U S A**., v. 102 p. 69-74, 2005.

GILBERT, DM. Replication timing and transcriptional control: beyond cause and effect. **Curr Opin Cell Biol.**, v.14 p. 377-83, 2002

GODOY, PD.; LA. NOGUEIRA-JUNIOR; L. S. PAES; A. CORNEJO; R. M. MARTINS; SILBER, A. M., ELIAS, M. C. Trypanosome pre replication machinery contains a single functional orc1/cdc6 protein, which is typical of archaea. **Eukaryot Cell** ., v.10 p. 1592-1603, 2009.

GOMEZ, EB; MG. CATLETT; SL. FORSBURG. Different phenotypes in vivo are associated with ATPase motif mutations in Schizosaccharomyces pombe minichromosome maintenance proteins. **Genetics** ., v. 160 p. 1305-1318, 2002.

GUILBRIDE, DL; P.T. ENGLUND. The replication mechanism of kinetoplast DNA networks in several trypanosomatid species. **J Cell Sci**., v. 111 p. 675-679, 1998.

HARTWELL, LH; MORTIMER, RK; CULOTTI, J.; CULOTTI, M. Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of cdc Mutants. **Genetics**., v. 74p. 267-86, 1973.

HERBIG, U.; C. A. MARLAR; E. FANNING. The Cdc6 nucleotide-binding site regulates its activity in DNA replication in human cells. **Mol Biol Cell**., v. 10 p. 2631-2645, 1999.

HO, SN.; HD. HUNT; RM. HORTON; JK. PULLEN; LR. PEASE. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. **Gene**., v. 77 p. 51-59, 1989.

ZHANG J; WANG Q; BARZ B; HE Z KOSZTIN; I. SHANG Y.; XU D. MUFOLD: A new solution for protein 3D structure prediction. Proteins: Structure., **Function, and Bioinformatics.** v.78 p. 1137-1152, 2010

KAGUN,I JM. DnaA: controlling the initiation of bacterial DNA replication and more. **Annu Rev Microbiol.**, v. 60 p. 351-375, 2006.

KATAYAMA, T; T., KUBOTA; K., KUROKAWA; E. CROOKE, AND K. SEKIMIZU. The initiator function of DnaA protein is negatively regulated by the sliding clamp of the E. coli chromosomal replicase. **Cell.**, v. 94 p. 61-71, 1998.

KHAYRUTDINOV, BI; BAE WJ; YUN YM; LEE, JH; TSUYAMA T; KIM JJ; HWANG, E; RYU KS; CHEONG HK; CHEONG C; KO JS; ENOMOTO T; KARPLUS PA; GUNTERT P; TADA S; JEON YH; CHO Y. Structure of the Cdt1 C-terminal domain: Conservation of the winged helix fold in replication licensing factors. **Protein Science**., v. 18 p. 2252-2264, 2009

KAWAKAMI, H; T. KATAYAMA. DnaA, ORC, and Cdc6: similarity beyond the domains of life and diversity. **Biochem Cell Biol.**, v. 88 p. 49-62, 2010

KLEMM, RD.; RJ. AUSTIN; SP. BELL. Coordinate binding of ATP and origin DNA regulates the ATPase activity of the origin recognition complex. **Cell**., v. 88 p. 493-502, 1997.

LEE, C.; HONG B.; CHOI, J. M.; KIM Y.; WATANABE S.; ISHIMI Y.; CHO Y. Structural basis for inhibition of the replication licensing factor Cdt1 by geminin. **Nature**., v. 430 p. 913-917, 2004.

LEE, DG.; MAKHOVAM.; KLEMM RD.; GRIFFITH JD.; BELL SP. Regulation of origin recognition complex conformation and ATPase activity: differential effects of single-stranded and double-stranded DNA binding. **The EMBO journal**., v.19 p. 4774-4782, 2000

LEE, M. G.; LH., VAN DER PLOEG. Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by RNA polymerase I. **Annu Rev Microbiol**., v. 51 p. 463-489, 1997.

LEI, M.; BK. TYE. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. **J Cell Sci**., v. 114 p. 1447-1454, 2001.

LEONARD, A.C; GRIMWADE, JE. Regulating DnaA complex assembly: it is time to fill the gaps. **Current opinion in microbiology.**, v.13 p.766-772, 2010.

LENZEN, CU. Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein., edited by S. W. **Whiteheart**, 1998.

LU, M.; JL. CAMPBELL; E. BOYE; N. KLECKNER. SeqA: a negative modulator of replication initiation in E. coli. **Cell.**, v. 77 p. 413-426, 1994.

MARAHRENS, Y.; B., STILLMAN. A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. **Science**., v.255 p. 817-823, 1992.

MASAI, H.; S., MATSUMOTO; Z. YOU N; YOSHIZAWA-SUGATA; M. ODA. Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? **Annu Rev Biochem**., v. 79 p. 89-130, 2010.

MATTHEWS, K. The developmental cell biology of Trypanosoma brucei. **Journal of Cell Science.**, v. 118 p.283-290, 2005a.

MCGEOCH, AT.; SD. Bell. Extra-chromosomal elements and the evolution of cellular DNA replication machineries. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**., v. 9 p.:569-574, 2008.

MENDEZ J.; B. STILLMAN. Perpetuating the double helix: molecular machines at eukaryotic DNA replication origins. **Bioessays**., v. 25 p.1158-1167, 2003.

MICHAEL, OBERHOLZER; MAL; KATHERINE, S; RALSTON. Chapter 2 – Approaches for Functional Analysis of Flagellar Proteins in African Trypanosomes. v. 93 p.21–57, 2009.

NEUWALD, AF.; L. ARAVIND; JL. SPOUGE; E. V. KOONIN. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. **Genome Res.**, v. 9 p.27-43

NGUYEN, V. Q., C. CO, AND J. J. LI. 2001. Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. **Nature.**, v. 411 p.1068-1073, 1999.

OKUNO, Y.; H., SATOH; M., SEKIGUCHI; H., MASUKATA. Clustered adenine/thymine stretches are essential for function of a fission yeast replication origin. **Mol Cell Biol**., v. 19 p.6699-6709, 1999.

PETERSEN, B; O., J., LUKAS, S. R. CS, J. BARTEK, AND K. HELIN. Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. **EMBO J** ., v. 18 p. 396-410, 1999.

PRASANTH, S. G., K. V. PRASANTH, AND B. STILLMAN. Orc6 involved in DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis. **Science.**, v. 297 p. 1026-1031, 2002.

RANDELL, J; J. BOWERS; H. RODRIGUEZ; S. BELL. Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase. **Molecular Cell**., v. 21 p. 29-39, 2006.

RIGGS P.; NE. Biolabs. Expression and purification of recombinant proteins by fusion to maltose-binding protein. **Molecular Biotechnology**., v. 15 p.51-63, 2013.

ROBINSON, NP.; I. DIONNE; M. LUNDGREN; VL. MARSH; R. BERNANDER, SD. BELL. Identification of two origins of replication in the single chromosome of the archaeon Sulfolobus solfataricus. **Cell**., v. 116 p. 25-38, 2004

SAMSON RACHEL Y.; BELL STEPHEN D. MCM Loading—An Open-and-Shut Case?. **Molecular cell**, v. 50, n. 4, p. 457-458, 2013.

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 genetics**, v. 5 p. 1000446, 2009

SPECK, C., AND B. STILLMAN. 2007. Cdc6 ATPase activity regulates ORC center dot Cdc6 stability and the selection of specific DNA sequences as origins of DNA replication. **Journal of Biological Chemistry.**, p. 282 v. 11705-11714, 2005.

SPECK, C.; Z. CHEN; H. LI, ; B. STILLMAN. ATPase-dependent, cooperative binding of ORC and Cdc6p to origin DNA. **Nat Struct Mol Biol**., v. 12 p. 965-971.

STUART, KD.; A. SCHNAUFER; N. L. ERNST ; AK. Panigrahi. Complex management: RNA editing in trypanosomes. **Trends Biochem Sci**., v. 30 p. 7-105, 2005.

TAKEHARA, M.; M., MAKISE; H. TAKENAKA; T., ASANO; T. MIZUSHIMA. Analysis of mutant origin recognition complex with reduced ATPase activity in vivo and in vitro. **Biochem J** v. 413 p. 535-543, 2008.

TATSUMI Y.; K. EZURA; K. YOSHIDA; T. YUGAWA; M. NARISAWA-SAITO; T. KIYONO; S. OHTA; C. OBUSE; M. FUJITA. Involvement of human ORC and TRF2 in pre-replication complex assembly at telomeres. Genes Cells 13 (10):1045-1059, 2008

TIENGWE, CALVIN, MARQUES CA.; MCCULLOCH, R. Nuclear DNA replication initiation in kinetoplastid parasites: new insights into an ancient process.**Trends in parasitology**., v. *30 p.* 27-36, 2014

TIENGWE, CALVIN; MARCELLO, H; FARR, N. DICKENS; S. KELLY; M. SWIDERSKI; D. VAUGHAN; K. GULL; JD. BARRY; SD. BELL; R. MCCULLOCH. Genome-wide analysis reveals extensive functional interaction between DNA replication initiation and transcription in the genome of Trypanosoma brucei. **Cell Rep**., v. 2 p. 185-197, 2012a.

TIENGWE, CALVIN.; L. MARCELLO, H; FARR; C. GADELHA; R. BURCHMORE; JD. BARRY; S.D. BELL; R. MCCULLOCH.. Identification of ORC1/CDC6-interacting factors in Trypanosoma brucei reveals critical features of origin recognition complex architecture. **PLoS One.**, v. 7 p. 32674, 2012b

TIENGWE, CALVIN; MARQUES, CATARINA A.; MCCULLOCH RICHARD. Nuclear DNA replication initiation in kinetoplastid parasites: new insights into an ancient process. **Trends in parasitology**, v. 30, n. 1, p. 27-36, 2014.

TSAKRAKLIDES, V.; SP., BELL. Dynamics of pre-replicative complex assembly.**J Biol Chem**., v. 285 p. 9437-9443, 2010.

ULLU, E.; C., TSCHUDI. Trans splicing in trypanosomes requires methylation of the 5' end of the spliced leader RNA, 1991.

WIRTZ, E.; C., CLAYTON. Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. **Science**., v**.** 268 p. 1179-1183, 1995.

WIRTZ, E; S.LEAL; C. OCHATT; GA. CROSS. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in Trypanosoma brucei. **Mol Biochem Parasitol**., v. 99 p. 89-101, 1999.

WOHLSCHLEGEL JA.; BT. DWYER; SK. DHAR; C. CVETIC; J. C. WALTER; A. DUTTA. Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. **Science**., v. 290 p. 2309-2312, 2000.