RICARDO PARIONA LLANOS

**CARACTERIZAÇÃO DE INTERAÇÕES
PROTEINA-DNA EM TRIPANOSSOMAS**

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

São Paulo
2014

RICARDO PARIONA LLANOS

**CARACTERIZAÇÃO DE INTERAÇÕES
PROTEINA-DNA EM TRIPANOSSOMAS**

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

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: 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 total

Llanos, Ricardo Pariona.

Caracterizações de interações DNA-proteínas em tripanosomas /
Ricardo Pariona Llanos. -- São Paulo, 2014.

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

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa:
Replicação de DNA em tripanosomas.

Versão do título para o inglês: Characterization of DNA-protein
interactions in trypanosomes.

1. *Trypanosma cruzi* 2. *Trypanosoma brucei* 3. Replicação de DNA
4. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 5. Telômero 6. Interação
proteína-DNA I. Sabbaga, Profa. Dra. Maria Carolina Quartim Barbosa
Elias. II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-
Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB022/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ricardo Pariona Llanos.

Título da Tese: Caracterizações de interações DNA-proteínas em tripanosomas.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Carolina Quartim Barbosa Elias Sabbaga.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) Aprovado(a)

(☐) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 330/09, referente ao projeto intitulado: *“Identificação de seqüências de DNA e de possíveis proteínas que interagem com ORC1/CDC6 em trypanosoma”* sob a responsabilidade de Ricardo Pariona LLanos, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

.....São Paulo, 18 de agosto de 2009.

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

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

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família, minha mãe Amelia, meus irmãos Lourdes e Alberto, pelo carinho de sempre e pelo apoio incondicional em todos os momentos, a meu amor Shila, que sempre esteve a meu lado, por todo carinho, apoio e compreensão, a meus amigos de fé que sempre torceram por mim, e a minha família toda, cujas lembranças que guardo me fortalecem nos momentos difíceis.

“in memoriam”

Dra. Toshie Kawano

Dr. Clodovaldo Pavan

AGRADECIMENTOS

A meu grande amor Shila, pelo amor incondicional, pelo todos os momentos que passamos juntos, pela cumplicidade, pelo carinho, pela amizade, pela confiança e que sempre esteve presente nos altos e baixos durante esta etapa da minha vida. Uma grande companheira para quem expresso toda minha gratidão.

A minha família por acreditar sempre em mim, minha mãe, irmãos e sobrinhos: Rebeca, Bruno, Renzo e Franco, apesar da distancia não perco o grande amor que sinto por eles, o meu eterno agradecimento.

Aos meus sogros, Alexander e Alicia, por me receberem na sua família com muito carinho.

A minha orientadora Carol, pela dedicação com que me orientou neste trabalho, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe, pela sabedoria de me entender por muitas vezes e estimular meu interesse, pela disponibilidade e por compartilhar seus conhecimentos, obrigado por todos esses anos de aprendizado.

A Simone, pela convivência agradável, o apoio, a ajuda, a solidariedade, a disponibilidade e pela amizade.

A Teresa por compartilhar momentos legais e pelas suas dicas sempre importantes.

A Daiane, pela convivência, sempre disposta a ajudar e pelas boas conversas no dia a dia no laboratório.

A Marina, pela convivência no laboratório e momentos de conversas.

A Raphael, por compartilhar o gosto pela ciência, pelas discussões de artigos e futebol, pela confiança, diversão e amizade.

A meus amigos que passaram pelo laboratório, Patrícia, Ellen e Luiz cuja lembrança sempre será inesquecível.

Aos Drs. Hugo, Marcella, Robson e Pedro, pela convivência agradável.

À Dra. Solange e a sua equipe pela convivência agradável e as conversas nos corredores.

À Dra. Julia pelas dicas no processo experimental, pela colaboração na análises de espectrometria de massa e a boa convivência. A seus alunos Mariana, Natali e Daniel pela convivência. Ao Ismael pelo apoio laboratorial e as conversas.

A Mari e Ivan, pela disposição em manter o laboratório funcionando e sempre estarem presente com sua ajuda importante, para o andamento de alguns experimentos e pelas boas conversas de descontração.

Aos colegas do laboratório Juliana Dias, Juliana Galvão, Ursula, Polyanna, Miriam, Cris, Bruno, Diego, Matheus, Eduardo, Marcelo e Leo, pela convivência, amizade, boas risadas e bons comentários.

A todos os funcionários do CAT, pelo suporte laboratorial.

A Omar e Henrique do laboratório de biotecnologia do Instituto Butantan, pela colaboração desinteressada e amizade.

Ao pessoal de Curitiba do laboratório do Instituto Carlos Chagas – Osvaldo Cruz (ICC-Fiocruz/PR), pela receptividade no laboratório e pelos bons momentos na minha estada em Curitiba.

À Dra. Giselle e Dr. Stenio (ICC-Fiocruz/PR), pelo apoio técnico e científico no ensaio da Imunoprecipitação de Cromatina.

Ao Dr. Bruno Dallagiovana (ICC-Fiocruz/PR), pelas sugestões no ensaio de transfecção e o processo de purificação proteica pelo sistema TAP. A Heloise, pela inestimável ajuda no laboratório nos meus experimentos, sempre disposta a auxiliar no que fosse possível com paciência e atenção.

À Dra. Isabel Cano, pela disposição, pelas inúmeras contribuições e conselhos na realização deste estudo.

Ao Dr. Ariel Silver pelas valiosas dicas neste trabalho, e seus alunos, Lisvane, Brian, Flavia, Josué, e Sandra, pelos momentos legais nos congressos e pela amizade.

Aos orientadores, funcionários e colegas do laboratório de parasitologia do Instituto Butantan, pelos bons momentos compartilhados.

A todos meus amigos que foram surgindo ao longo da minha vivência no Brasil. Obrigado a todos vocês, pelo aprendizado que vai mais além do conhecimento e que levarei a vida toda.

À diretoria do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por depositar a confiança e a possibilidade de fazer o meu Doutorado nesta instituição.

À USP, em particular a COSEAS pelo apoio de moradia no CRUSP, que me brindou um lugar para morar durante a realização de meu doutorado e que me deu a possibilidade de conhecer a muitas pessoas de este maravilhoso país.

A FAPESP, pelo suporte financeiro ao trabalho experimental e pela bolsa concedida durante meu doutorado.

“A vida é um caminho de sombras e luzes. O importante é que se saiba vitalizar as sombras e aproveitar as luzes.”
Bergon, Henri

RESUMO

PARIONA LLANOS, R. **Caracterização de interações proteína-DNA em tripanossomas.** 2014. 99 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas, continua sendo na América latina um problema importante de saúde pública. Este trabalho aborda aspectos moleculares sobre a replicação do DNA e a manutenção das extremidades cromossômicas neste parasita. Esses aspectos serão apresentados a seguir em duas partes. **i)** A replicação do DNA é um processo regulado pela célula e começa com a formação do complexo de pré-replicação em regiões específicas do DNA. Nas leveduras, é bem definida a existência de um complexo de pré-replicação denominada ORC. Este complexo é formado por seis subunidades Orc1-Orc6. Várias evidências sugerem que a ORC determina onde a replicação de DNA pode acontecer, fato observado em Archaea, levedura, *Drosophila* e mamíferos. Os tripanosomas não apresentam um complexo ORC formado por seis proteínas, mas foi mostrado por nosso grupo que a proteína Orc1/Cdc6 de *Trypanosoma* é um componente da maquinaria de pré-replicação. Além disso, uma análise do genoma de tripanosomas demonstrou que diferente dos outros eucariontes, esses parasitas não apresentam o componente da maquinaria de pré-replicação Cdt1. Assim, um dos objetivos deste trabalho foi buscar moléculas que interajam fisicamente com Orc1/Cdc6 a fim de identificar outros componentes da maquinaria de pré-replicação de tripanosomas. Para tanto, foram geradas linhagens da forma proliferativa epimastigota de *T. cruzi* contendo o gene Orc1/Cdc6 fundido ao epitopo TAG. Os extratos celulares destas linhagens foram purificados em colunas de afinidade e as moléculas obtidas foram identificadas por espectrometria de massa. Após caracterização foi identificada uma sequência que se encontra no genoma de *T. cruzi* (Tc00.1047053503439.61) e que apresenta homologia com a Orc2 de *D. Melanogaster*. Este dado pode indicar a possível presença de outros componentes do complexo ORC de tripanosomas. **ii)** O gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma proteína multifuncional com funções em vários processos subcelulares, tal como a proteção do cromossomo terminal em células de mamíferos contra a degradação rápida por a sua capacidade de ligar se ao DNA telomérico. Neste trabalho, foi demonstrado que a GAPDH recombinante de *T. cruzi* (rTcGAPDH) é capaz de interagir com o DNA telomérico. Através de ensaios de EMSA, mostramos que a rTcGAPDH liga ao oligonucleótido de simples fita tendo pelo menos uma repetição telomérica. Através de ensaio de ChIP, conseguimos demonstrar que a GAPDH interage com DNA telomérico in vivo em células epimastigotas proliferativas. A concentração intracelular de NADH é mais elevada do que a de NAD^+ nestas células, mas a adição de NAD^+ exógeno foi capaz de bloquear esta interação. Corroborando a hipótese de que o equilíbrio NAD^+/NADH determina a interação GAPDH-telômero, verificamos que o tripomastigota não proliferativo apresenta maior $[\text{NAD}^+]$ intracelular que a $[\text{NADH}]$ e nestas células a GAPDH não é capaz de ligar se ao DNA telomérico. Além disso, o NADH exógeno é capaz de resgatar a interação GAPDH-telômero nesta fase. Nossos dados evidenciam a importância do equilíbrio NAD^+/NADH na interação de DNA telomérico-GAPDH em tripanosomas, sugerindo que a proteção do extremo terminal do cromossoma do parasita pode ser regulada pelo estado metabólico das células.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. *Trypanosoma brucei*. Replicação do DNA. GAPDH. Telômero. Balanço NAD^+/NADH .

ABSTRACT

PARIONA LLANOS, R. **Characterization of protein-DNA interactions in trypanosomes.** 2014. 99 p. Ph. D. Thesis in (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease remains a major public health problem in Latin America. This paper focuses on molecular aspects of DNA replication and the maintenance of chromosome extremes within such parasite. These aspects are presented below in two parts. i) DNA replication is a process regulated by the cell and begins with the formation of the pre-replication complex at DNA specific regions. The existence of a pre-replication complex called ORC is well-defined in yeasts. This complex consists of six subunits Orc1-Orc6. Evidence suggests that the ORC determines where DNA replication can happen, just as it was observed in Archaea, yeast, *Drosophila* and mammals. Trypanosomes do not have an ORC complex formed by six proteins, but as it has been shown by our team, the Orc1/Cdc6 protein is a component of the pre-replication machinery in *Trypanosoma*. Furthermore, an analysis of the genome of trypanosomes showed that, unlike other eukaryotes, the Cdt1 pre-replication machinery component is not observed in such parasites. For that reason, one of the objectives of this work is to find out molecules that interact physically with Orc1/Cdc6 in order to identify other components of the trypanosomes pre-replication machinery. For that end, some *T. cruzi* epimastigote proliferative lines were generated containing the Orc1/Cdc6 gene fused to the epitope tag. The cell extracts of these lines were purified by means of affinity columns and the resulting molecules were identified through mass spectrometry. After characterization, a nucleotide sequence found in the *T. cruzi* genome (Tc00.1047053503439.61) was identified, demonstrating homology with Orc2 of *D. melanogaster*. This result indicates the possible presence of other ORC complex components in trypanosomes. ii) The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a multifunctional protein in various subcellular processes, such as the protection of the chromosome extremes in mammalian cells against rapid degradation by its ability to bind to the telomeric DNA. In this work, it was demonstrated that the recombinant GAPDH of *T. cruzi* (rTcGAPDH) is capable of interacting with the telomeric DNA. It was observed, through EMSA tests, that the rTcGAPDH binds to the single stranded oligonucleotide, having at least one telomeric repeat. ChIP tests demonstrated, on the other hand, that the GAPDH interacts with in vivo telomeric DNA in proliferative epimastigote cells. The NADH intracellular concentration is higher than that of NAD⁺ in such cells. However, the interaction was blocked through the addition of exogenous NAD⁺. Corroborating the hypothesis that the NAD⁺/NADH balance determines the GAPDH-telomere interaction, it was found that the non-proliferative tripomastigote has higher intracellular [NAD⁺] than [NADH], and the GAPDH is unable to connect itself to the telomeric DNA in these cells. In addition to that, the exogenous NADH can rescue the GAPDH-telomere interaction at this stage. Finally, our data has stressed the importance of the NAD⁺/NADH balance in the interaction of telomeric DNA/-GAPDH in trypanosomes, suggesting that the protection of telomere of the parasite can be regulated by the metabolic state of the cells.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. *Trypanosoma brucei*. DNA replication. GAPDH. Telomere. NAD⁺/NADH balance.

LISTRA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração de <i>Trypanosoma cruzi</i> demonstrando as estruturas e organelas específicas dos tripanosomas	21
Figura 2 - Distribuição geográfica da tripanossomíase americana ou doença de Chagas, causada pelo parasita <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
Figura 3 - Desenho esquemático do ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
Figura 4 - Distribuição geográfica da tripanossomíase africana humana ou doença do sono, causada pelo parasita <i>Trypanosoma brucei</i>	25
Figura 5 - Desenho esquemático do ciclo biológico de <i>Trypanosoma brucei</i>	26
Figura 6 - Árvore filogenética dos organismos vivos	28
Figura 7 - Desenho esquematizado das diferenças do complexo ORC de leveduras e tripanosomas	31
Figura 8 - (A) estrutura quaternária da GAPDH de <i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener. (B) participação da GAPDH na reação metabólica	33
Figura 9 - Desenho esquematizando as funções não glicolíticas da proteína GAPDH nuclear (GAPDH _N)	35
Figura 10 - Constituição do telômero	38
Figura 11 - Esquematização das estruturas protetoras do telômero. (A) Estrutura “G-quadruplex” e (B) Estrutura “T-loop”	39
Figura 12 - Formas (A) “capped” e (B) “uncapped” do telômero associado a complexos proteicos	40
Figura 13 - Comparação das proteínas do complexo shelterin em diversos organismos eucarióticos	41
Figura 14 - Modelo do complexo entre GAPDH e DNA telomérico humano	42
Figura 15 - Frações celulares obtidas a partir do extrato diferencial	59
Figura 16 - Frações celulares obtidas a partir do extrato diferencial	60
Figura 17 - Representação ilustrativa do epitopo TAP tag	62
Figura 18 - Expressão de Orc1/cdc6 fundida ao epitopo TAP-tag	62
Figura 19 - Curva de crescimento dos parasitas transfectados	63
Figura 20 - Padronização do tampão para extrato proteico	64
Figura 21 - Amostra dos parasitas transfectados na etapa de purificação da TAP tag Orc1/Cdc6 em resina de IgG	65

Figura 22 - Orc1/Cdc6 é eluída da coluna de IgG após digestão com TEV protease	66
Figura 23 - Extrato de parasita na segunda etapa de purificação da TAP tag Orc1/Cdc6 em coluna de calmodulina	66
Figura 24 - Proteína Orc1/Cdc6 identificada por espectrometria de massa	68
Figura 25 - Sequencia identificada por espectrometria de massa	68
Figura 26 - Interação da proteína GAPDH com o DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei</i>	69
Figura 27 - Expressão de GAPDH durante o ciclo celular de <i>T. cruzi</i>	70
Figura 28 - Interação da proteína GAPDH com o DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> forma tripomastigota	71
Figura 29 - Proteína rTcGAPDH e oligonucleotídeos utilizados no ensaio do EMSA	72
Figura 30 - Interação da proteína GAPDH com o oligonucleotídeos do telômero	72
Figura 31 - Interação da proteína GAPDH com o oligonucleotídeos do telômero	73
Figura 32 - Interação da proteína GAPDH com o oligonucleotídeos simples fita do telômero	73
Figura 33 - Interação da proteína GAPDH com diferentes tamanhos de oligonucleotídeos simples fita do telômero	74
Figura 34 - Competição na interação da proteína GAPDH-DNA telomérico por oligonucleotídeos contendo sequência telomérica não marcada (frio)	75
Figura 35 - Competição na interação da proteína GAPDH-DNA telomérico por oligonucleotídeos contendo sequência inespecífica (MCM subunidade 4) não marcada (frio)	76
Figura 36 - Competição na interação da proteína GAPDH-DNA telomérico por NAD ⁺ e NADH	77
Figura 37 - Imunoprecipitação da proteína GAPDH no extrato celular de <i>Trypanosoma cruzi</i>	78
Figura 38 - Ensaio de ChIP com anti-rTcGAPDH em Tripanosomas	79
Figura 39 - Ensaio de ChIP com anti-rTcGAPDH em cultura de Tripanosoma, tratadas com NAD ⁺ ou NADH	80
Figura 40 - Interação proteína-DNA nas formas epimastigota e tripomastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	81
Figura 41 - Ensaio de ChIP com anti-rTcGAPDH em tripomastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> na presença de NAD ⁺ e NADH	82

Figura 42 - Acoplamento computacional da proteína GAPDH e a simples fita de DNA telomérico em <i>Trypanosoma cruzi</i>	83
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação dos cromossomas e de sua replicação nas bactérias e eucariontes ...	30
Tabela 2 - Composição das sequencias teloméricas presente nos diferentes organismos	37
Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados na interação com a rTcGAPDH	52
Tabela 4 - Mistura de reagentes para reação de interação da proteína GAPDH e o oligonucleotídeos previamente marcado	53
Tabela 5 - Mistura de reagentes para reação de competição na interação da proteína GAPDH e o oligonucleotídeos previamente marcado	54
Tabela 6 - Quantidade de proteínas identificadas por espectrometria de massa	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	adenosina trifosfato
BSA	bovine serum albumine
CDC	cell division cycle
CDT1	cdc10-dependent transcript factor 1
ChIP	chromatin imuno precipitation
CPR	complexo de pré-replicação
DEPC	dietil pirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNase	desoxirribonuclease
dNTP	desoxiribonucleosídeo trifosfato
DTT	dithiothreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ETOH	álcool etílico
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
HSP	<i>heat shock protein</i> , proteína de choque térmico
IPTG	isopropil-1-tio-D-galactopiranosídeo
Kb	1000 nucleotídeos em DNA
kDa	quilo Dalton
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIT	<i>liver infusion tryptose</i>
M	molar ou mol/L
Mb	1000 kb
MgOAc4	acetato de Magnésio
MBP	maltose binding protein
MCM	minichromosome maintenance
NaAc	acetato de sódio
NAD	nicotinamida adenina dinucleotido hidreto
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide hidreto
ORC	<i>origin recognition complex</i>
PAGE	gel de poliacrilamida
Pb	pares de base
PBS	fosfato buffer saline
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
qsp	quantidade suficiente para
RPA	<i>replication protein A</i>
rpm	revoluções por minuto
SBF	soro bobino fetal
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida desnaturante com SDS
SSC	sal, citrate de sódio
TAP	<i>tandem affinity purification</i>
TMG	trimetilguanosina
Tris	hidroximetil aminometano
TRF1	telomere repeat binding factor 1
WHIP	winged-helix initiator protein
ZPFM	zimmerman post-fusion medium

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
<u>1.1</u>	<u>Trypanosoma</u>	21
1.1.1	<i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	22
1.1.1.1	O ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> e transmissão	23
1.1.2	<i>Trypanosoma brucei</i> e a doença do sono	25
1.1.2.1	O ciclo de vida de <i>Trypanosoma brucei</i> e transmissão	26
<u>1.2</u>	<u>Replicação do DNA</u>	28
1.2.1	Complexo de pré-replicação	28
1.2.1.1	Eucarionte	29
	A Metazoários	29
	B Leveduras	30
1.2.1.2	Archaea	30
1.2.2	Complexo de pré-replicação em tripanosomas	32
<u>1.3</u>	<u>Proteína Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)</u>	33
1.3.1	Estrutura e função	33
1.3.2	Regulação da GAPDH	34
1.3.3	Localização da GAPDH nuclear	35
1.3.4	A proteína multifuncional GAPDH	36
1.3.4.1	GAPDH na fusão da membrana nuclear	36
1.3.4.2	GAPDH na interação com ácidos nucleicos	37
1.3.4.3	GAPDH na regulação transcricional	37
1.3.4.4	GAPDH na morte celular	37
1.3.4.5	GAPDH na manutenção na estrutura telomérica	38
<u>1.4</u>	<u>O Telômero</u>	38
1.4.1	Estrutura	39
1.4.2	Proteínas que protegem o telômero	40
<u>1.5</u>	<u>Interação entre a GAPDH e o Telômero</u>	43
2	OBJETIVOS	44
<u>2.1</u>	<u>Objetivos gerais</u>	45
<u>2.2</u>	<u>Objetivos específicos</u>	45

3	<i>MATERIAIS E MÉTODOS</i>	46
3.1	<i>Parasitas</i>	47
3.2	<i>Tripomastigotas de cultura de células</i>	47
3.3	<i>Obtenção do Extrato diferencial de Trypanosoma</i>	47
3.4	<i>Transfecção dos Parasitas</i>	48
3.5	<i>Preparação dos extratos dos parasitas tranfectados</i>	49
3.6	<i>Ensaio de Western Blotting</i>	49
3.7	<i>Obtenção de extrato protéico e purificação protéica por TAP tag</i>	50
3.8	<i>Ensaio de Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)</i>	51
3.9	<i>Extração de DNA usando fenol clorofórmio</i>	51
3.10	<i>Obtenção do DNA telomérico usando como sonda na hibridização</i>	52
3.11	<i>Proteína recombinante Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)</i>	52
3.12	<i>Desenho dos oligonucleotídeos (iniciadores)</i>	53
3.13	<i>Obtenção dos oligonucleotídeos marcados</i>	53
3.14	<i>Obtenção dos oligonucleotídeos de dupla fita</i>	54
3.15	<i>Interação proteína/DNA</i>	54
3.16	<i>Competição da interação proteína/DNA</i>	55
3.17	<i>Quantificação de NAD⁺/NADH</i>	55
3.18	<i>Espectrometria de Massa</i>	56
3.19	<i>Análise de citometria de fluxo (FACs)</i>	57
3.20	<i>Análise computacional da interação GAPDH e DNA telomérico em T. cruzi.</i>	57
4	<i>RESULTADOS</i>	58
4.1	<i>Possíveis proteínas associadas à Orc1/Cdc6 em Trypanosoma cruzi</i>	59
4.1.1	<i>Enriquecimento de Orc1/Cdc6 em frações celulares para a análise por espectrometria de massa</i>	59
4.1.2	<i>Super expressão da proteína Orc1/Cdc6 em Trypanosoma cruzi</i>	62
4.1.2.1	<i>Ciclo celular dos parasitas tranfectados</i>	64
4.1.2.2	<i>Obtenção de extrato protéico e purificação protéica por TAP tag</i>	64
	<i>A Clivagem do sitio TEV</i>	66
	<i>B Ligação na coluna de calmodulina</i>	67
4.1.2.3	<i>Caracterização da proteína Orc1/Cdc6 no parasita tranfectado</i>	68

<u>4.2</u>	<u>Controle do balanço redox NAD^+/$NADH$ na interação da proteína GAPDH com o DNA telomérico de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei</i></u>	70
4.2.1	A proteína GAPDH interage com o DNA em tripanosomas	70
4.2.2	A GAPDH esta presente, associada ao DNA durante todo o ciclo celular de <i>T. cruzi</i>	71
4.2.3	A proteína GAPDH da forma tripomastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> não interage com o DNA	71
4.2.4	<i>rTcGAPDH</i> interage com a simples fita de DNA telomérico <i>in vitro</i>	72
4.2.5	O NAD^+ inibe a interação da <i>rTcGAPDH</i> com a simples fita telomérica	77
4.2.6	<i>rTcGAPDH</i> interage com o DNA telomérico <i>in vivo</i>	79
4.2.7	O NAD^+ inibe a interação da GAPDH com o DNA telomérico <i>in vivo</i> nos <i>Trypanosomas</i>	80
4.2.8	A proteína GAPDH na interage com o DNA telomérico do tripomastigota de <i>T. cruzi</i> <i>in vivo</i>	81
4.2.9	Análise estrutural da interação da GAPDH e o DNA telomérico	83
5	DISCUSSÃO	85
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
	REFÊRENCIAS	92

1.1 Trypanosoma

Os tripanosomas são organismos eucariontes unicelulares. Taxonomicamente pertencem ao reino protista, classe kinetoplastida, ordem trypanosomatida e família trypanosomatidae.

Todos os protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae apresentam características próprias que diferem quando comparados com os outros eucariontes (**Figura 1**). Entre as características mais importantes próprias do reino podemos mencionar: a estrutura flagelar que permite a mobilidade ao parasita e que varia de 2 μm a 20 μm durante o ciclo de vida; o citóstomo, área de invaginação menor próximo à bolsa flagelar responsável pela absorção de nutrientes (PORTO-CARREIRO et al., 2000); a membrana plasmática revestida interiormente por microtubulos em camadas, que são denominadas como microtúbulos sub-peculiares e que oferecem resistência e rigidez frente ao rompimento mecânico; e, por fim, a estrutura tubular denominada axonema formada por microtúbulos (DE SOUZA, 2002).

Outra característica dos tripanosomas que os diferenciam dos outros grupos é a presença de uma mitocôndria única que se estende ao longo do corpo do protozoário e a presença do cinetoplasto, estrutura diferenciada da mitocôndria que contém todo o material genético mitocondrial. Este é caracterizado por uma extensa rede de DNA contendo aproximadamente 20% do DNA total dos tripanosomatídeos (JUNQUEIRA et al., 2005; LUKES et al., 2002).

Cabe mencionar a presença de uma organela especializada coberta por uma membrana vesicular denominada peroxissomo de aproximadamente 0,7 μm distribuídos no citoplasma, responsáveis por armazenar enzimas relacionadas à via glicolítica, como o peróxido de hidrogênio e a gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (HANNAERT et al., 2003). Essa organela também participa na fixação de dióxido de carbono e síntese de pirimidina (DE SOUZA, 2003).

Figura 1 - Ilustração de *Trypanosoma cruzi* demonstrando as estruturas e organelas específicas dos tripanosomas.

FONTE: <http://labspace.open.ac.uk/>

1.1.1 *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas ou tripanossomíase americana. A doença de chagas teve sua primeira descrição em 1909, onde foram descritos alguns aspectos epidemiológicos básicos da doença como o agente causador, o agente transmissor e a existência de reservatórios vertebrados tanto silvestres como domésticos do parasita. O tipo de transmissão desta doença é vetorial, o *T. cruzi* transmite a doença através de insetos vetores hematófagos de hábitos noturnos e comumente conhecidos como inseto barbeiro ou triatomídeos. Foi observado que o *Triatoma infestans* (classe hemíptera, família reduviidae e subfamília triatomidae) é a espécie de triatomídeos com maior importância na transmissão da doença de Chagas (KOLLIEN; SCHAUB, 2000).

Segundo a organização mundial da saúde a doença de Chagas está distribuída pelas Américas desde a Argentina até o sul dos Estados Unidos (**Figura 2**). Sabe-se que aproximadamente 10 milhões de pessoas estão infectadas com o parasita no mundo, onde se destaca 21 países na América Latina. Mais de 25 milhões de pessoas estão em áreas de risco (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Figura 2 - Distribuição geográfica da tripanossomíase americana ou doença de Chagas, causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*.

FONTE: <http://www.who.int/en/>

A manifestação clínica nos infectados com a doença de Chagas pode ser sintomática ou assintomática, sendo esta última mais frequente entre os pacientes (90% - 98%). A doença de Chagas apresenta duas fases: a fase aguda caracterizada pela alta parasitemia cujos sintomas são febre, edemas e dor generalizado no corpo; e a fase crônica que apresenta manifestação clínica a nível digestiva esofágica e complicações cardíacas (BRENER et al., 2000).

Apesar dos esforços para combater a tripanossomíase americana, para o tratamento são somente utilizados dois medicamentos: Benzonidazol (Rochagan[®], Roche) e Nifurtimox (Lampit[®], Bayer), os quais atuam nas formas amastigotas e tripomastigotas sanguíneas do parasita. Atualmente, no Brasil comercializa-se somente o Benzonidazol (COURA; DE CASTRO, 2002).

1.1.1.1 O ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* e transmissão

O *T. cruzi* é considerado um organismo heteroxênico, ou seja, apresenta dois hospedeiros: um vertebrado (vários mamíferos, entre eles o homem) e um invertebrado (insetos hematófagos). Estes parasitas apresentam formas morfológicas diferenciadas nos respectivos hospedeiros. No hospedeiro invertebrado são encontradas as formas replicativa não infecciosa (epimastigotas) e a não replicativa infecciosa (tripomastigotas metacíclicas),

entretanto, no hospedeiro vertebrado estão presentes a forma replicativa intracelular (amastigotas) e a forma infectiva não replicativa (tripomastigotas) (DE SOUZA, 1999).

O ciclo de vida começa quando o hospedeiro invertebrado (triatomídeo) suga o sangue do hospedeiro vertebrado infectado, ingerindo os parasitas na forma tripomastigota sanguicola, os quais ao chegarem ao longo do trato digestivo do inseto se transformam na forma epimastigota. Após sucessivas divisões celulares, os parasitas se fixam na porção posterior do intestino caracterizado por ser deficiente em nutrientes (KOLLIEN; SCHAUB, 2000) onde ocorre a diferenciação dos parasitas para a forma tripomastigota metacíclica (a forma não replicativa), capaz de infectar o hospedeiro vertebrado (DE SOUZA, 2002). O ambiente nutricional tem um papel importante no processo de diferenciação celular dos parasitas uma vez que a transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos envolve um estresse nutricional. Esse estresse ocorre no aparelho digestivo dos insetos triatomíneos, resultando em mudanças no ambiente intestinal, ocasionada pela ingestão de enormes quantidades de sangue, seguida por uma diurese forte, digestão lenta e ocasionalmente períodos de fome (KOLLIEN; SCHAUB, 2000).

O ciclo de vida no hospedeiro vertebrado começa após alimentação do inseto vetor, quando o parasita é expulso na urina e nas fezes na forma de tripomastigota metacíclico com capacidade de infectar as células, através de mucosas ou ferimentos na epiderme do hospedeiro. No interior das células do hospedeiro, os tripomastigotas metacíclicos se diferenciam em formas amastigotas intracelulares e logo rompem a membrana do vacúolo parasitoforo, formado por lisossomos fusionados que envolvem os parasitas, invadindo então o citoplasma da célula hospedeira. As formas amastigotas apresentam sucessivas divisões no citoplasma, diferenciando-se então em tripomastigotas (ANDREWS et al., 1990). Ocorre então a ruptura da célula, liberando os parasitas no sangue do hospedeiro, tendo assim a forma tripomastigota sanguicola, com capacidade de infectar outras células ou ser ingeridos pelo inseto vetor, fechando assim o ciclo de vida do parasita (ANDREWS et al., 1990) (**Figura 3**).

Figura 3 - Desenho esquemático do ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.

FONTE: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

1.1.2 *Trypanosoma brucei* e a doença do sono

O *Trypanosma brucei* é o agente etiológico da doença do sono ou tripanossomíase africana humana. Teve seu primeiro reporte em 1894 associados a doenças em animais domésticos e selvagens na África. Na atualidade esta doença afeta a humanos e é considerado fatal se permanecer sem tratamento.

A Organização Mundial da Saúde calcula que a tripanossomíase africana humana esta distribuída em 36 países no continente africano (**Figura 4**). Os dados mostram que esta doença atinge 300.000 pessoas e a população em risco de contrair esta doença é estimada em 70 milhões de pessoas (WHO, 2009).

Figura 4 - Distribuição geográfica da tripanosomíase africana humana ou doença do sono, causada pelo parasita *Trypanosoma brucei*.

FONTE: <http://www.who.int/en/>

A doença do sono pode apresentar várias sintomatologias, e isto dependerá do parasita transmissor: a fase crônica originada pelo *Trypanosoma brucei gambiense* é caracterizada pela baixa parasitemia; enquanto a fase aguda causada pelo *Trypanosoma brucei rhodesiense* é caracterizada por ser mais agressiva, de evolução rápida e alta parasitemia (BARRET et al., 2003).

Para o tratamento desta doença na fase inicial é utilizada a Pentamidina[®] que atinge o *T. brucei gambiense* e a Suramina[®] que ocasiona a morte do *T. brucei rhodesiense*. O tratamento é mais complexo na fase crônica, porque o medicamento precisa atravessar a barreira do sistema nervoso central. Nesta fase, o Melarprosol[®] é mais eficaz (KENNEDY, 2004).

1.1.2.1 O ciclo de vida de *Trypanosoma brucei* e transmissão

O *Trypanosoma brucei* apresenta no ciclo de vida diferentes formas morfológicas, a procíclica (replicativa), a metacíclica (não replicativa), a epimastigota (replicativa), a sanguicola replicativa (Slender) e a sanguicola não replicativa (Stumpy). Essas mudanças de morfologia que ocorrem durante o ciclo de vida ainda não estão bem definidas. Esses parasitas não apresentam a forma amastigota e a forma tripomastigota não invade células,

permanecendo nos líquidos corporais como o sangue e fluidos extracelulares, onde se alimentam e multiplicam (BARRET et al., 2003).

Na **Figura 5** mostra-se as diferentes fases do ciclo biológico de *T. brucei*, que começa quando a mosca Tse-tsé (*Glossina* sp.) contaminada com as formas tripomastigotas metacíclicas transmitem o parasita ao hospedeiro mediante picada. No hospedeiro, o parasita se diferencia na forma tripomastigota sanguínea eslender, os quais se multiplicam por fissão binária, alguns se transformam na forma tripomastigota sanguínea stumpy pré adaptados à mosca Tse-tsé. Os parasitas podem transitar pelo fluxo sanguíneo, onde podem atingir o sistema nervoso central. O hospedeiro pode sofrer uma picada por outra mosca, que será contaminada com as formas tripomastigotas sanguíneas stumpy. Essas formas diferenciam-se em formas procíclicas no intestino médio do inseto. Após proliferação do parasita no intestino, eles migram à glândula salivar da mosca transformando-se na forma epimastigota, que sofrem várias multiplicações antes de transformarem-se em tripomastigotas metacíclicos, assim reiniciando o ciclo (LAXMAN; BEAVO, 2007).

Figura 5 - Desenho esquemático do ciclo biológico de *Trypanosoma brucei*.

FONTE: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

1.2 Replicação do DNA

O processo de replicação do DNA consiste na síntese de uma nova fita de DNA a partir do emparelhamento de nucleotídeos livres com os nucleotídeos de uma simples fita de DNA que serve como molde, seguindo a regra do pareamento de bases complementares. Dessa forma, o cromossomo é replicado. O processo de replicação inicia-se com a formação do complexo de pré-replicação em regiões do DNA denominadas origem de replicação.

Os mecanismos que controlam o início da replicação são altamente regulados pela célula. Modelos iniciais sugerem que a duplicação do DNA começa quando uma proteína, conhecida como iniciador, liga-se ao DNA em uma sequência específica. A proteína iniciadora recruta os fatores que irão desenrolar o DNA e montar o replissomo, evento que exige alto gasto de ATP (RANDELL et al., 2006).

1.2.1 Complexo de pré-replicação

O complexo de pré-replicação é formado na montagem de uma série de proteínas sobre a origem de replicação. Primeiramente, o complexo ORC (origin recognition complex), formado por seis subunidades Orc1-Orc6 (BELL; STILLMAN, 1992) se liga à dupla fita de DNA. Atualmente várias evidências sugerem que a ORC determina onde a replicação de DNA pode acontecer, fato observado em organismos como Archaea, levedura, Drosophila e mamíferos (ABDURASHIDOVA et al., 2003; LANDENBURGER et al., 2002).

Após montado o complexo ORC no DNA, a proteína Cdc6 (cell division cycle) é inserida no complexo (SPECK et al., 2005). Neste momento, o complexo $ORC_{(1-6)}/Cdc6$ recruta à proteína Cdt1 (chromatin licensing and DNA replication factor 1), proteína que apresenta um papel fundamental no controle do processo de replicação (FUJITA, 2006), para formar o complexo $ORC_{(1-6)}/Cdc6/Cdt1$. Cdt-1 direciona ao complexo o hexâmero Mcm_{2-7} (minichromosome maintenance), que apresenta atividade de helicase sendo peça chave na atividade de replicação (MENDEZ; STILLMAN, 2003). Finalmente, com o recrutamento do hexâmero é formado o complexo de pré-replicação “ $ORC_{(1-6)}/Cdc6/Cdt1/Mcm_{(2-7)}$ ” (ROBINSON; BELL, 2005).

È importante mencionar que a replicação de DNA acontece em todos os organismos vivos, mas esse processo é característico para cada grupo, separado filogeneticamente (**Figura 6**).

Figura 6 - Árvore filogenética dos organismos vivos.

Neste desenho são mostrados os três grandes grupos separados filogeneticamente: Bactéria, Archaea e Eukarya, baseado em dados de seus respectivos rRNA. FONTE: WOESE, 1977.

1.2.1.1 Eucarionte

A Metazoários

O cromossomo de metazoários tem múltiplas origens de replicação (espaçadas de 3 a 300 Kb) dependendo tanto da espécie como do tecido (GILBERT, 2002). Entre os metazoários que mais se destacam pela sua importância como modelos de estudo mencionaram as espécies *Xenopus* e *Drosophila*.

Assim como em leveduras, foi descrito um similar complexo ORC, composto por seis subunidades (Orc₁ - Orc₆) em *Xenopus laevis* (ROWLES et al., 1996) e *Drosophila melanogaster* (GOSSEN et al., 1995), mas não foi encontrado uma única sequência consenso de DNA que serve como origem de replicação, na qual ORC possa se ligar. O processo de replicação nestes organismos é bidirecional. A replicação de DNA começa com a montagem do complexo de pré-replicação, onde o complexo ORC se liga à dupla fita de DNA. Depois de formada a interação entre a proteína e o DNA é recrutada a proteína Cdc6 e finalmente é carregada a proteína Cdt1 que carrega o complexo MCM₂₋₇, formando assim, o complexo de pré-replicação de DNA (ROWLES et al., 1999).

B *Leveduras*

As leveduras são organismos comumente usados como modelo de estudo para entender o mecanismo da replicação de DNA em eucariontes. Para que a replicação de DNA aconteça, precisa antes da montagem do complexo de pré-replicação, que em leveduras apresenta um complexo ORC que reconhece a origem de replicação e se liga à dupla fita de DNA, este complexo é formado por seis subunidades (Orc1-Orc6).

O complexo ORC foi descrito pela primeira vez em *Saccharomyces cerevisiae* (BELL; STILLMAN, 1992). As seis subunidades que compõem esse complexo são essenciais para a viabilidade celular e se ligam coletivamente à origem de replicação denominada nestes organismos sequencia de replicação autônoma (ARS), cuja função é receber os fatores de replicação essenciais para o início da replicação de DNA (DUTTA; BELL, 1997; KELLY; BROWN, 2000).

As ARS tem entre 100 a 120 pb e são caracterizadas por uma região central rica em AT, as leveduras apresentam aproximadamente 400 cópias de ARS no seu genoma, as quais tem sequencias de nucleotídeo altamente conservadas na região central e variáveis nas regiões mais externas. A região central dos ARS esta composta por 11 pares de bases ricas em AT (5' T/ATTTAYRTTTT/A 3'), conhecida como sequencia consenso ARS, que parecem ser análogas às sequencias de 13 nucleotídeos ricas em AT presentes na OriC de *E. coli*. A ligação das proteínas do complexo ORC nessas sequencias favorecem a abertura da dupla fita de DNA, nas sequencias centrais ricas em AT. A abertura do DNA são estabilizadas pelas proteínas de união à simples fita e pela RPA (*replication protein A*). Uma vez, estabilizado o DNA, uma helicase estende a região aberta, permitindo que a polimerase δ , polimerase α e a proteína PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) se introduzam na origem de replicação, e assim comece a síntese de DNA (THEIS; NEWLON, 2001; NEWLON, 1996).

1.2.1.2 Archaea

As archaeas são organismos unicelulares, cuja estrutura cromossômica circular é parecida às bactérias, no entanto, a maquinaria de replicação cromossomal é semelhante à apresentada pelos organismos eucarióticos (**Tabela 1**) (LUNDGREN; BERNADER, 2005).

A replicação de DNA é um processo bidirecional, ao igual que em bactérias, apresentam múltiplas origines de replicação assim como os de eucariotos, mas o cromossomo

das archaeas é único e muito menor quando comparada com os eucariontes (ZHANG et al., 2008).

Enquanto nos eucariontes existe um complexo protéico que reconhece a origem de replicação, em archaeas pode existir uma única proteína que desempenha a função de reconhecer a origem e auxilia na replicação do DNA, essa proteína é chamada de Orc1/Cdc6 (GRAINGE et al., 2003). Ao igual que em alguns eucariontes como em tripanosomatídeos não foi descrito ainda a proteína Cdt1 nestes organismos, mas foi identificada uma proteína candidata em archaea com homologia à Cdt1 eucariótica, chamada de WHIP (*winged-helix initiator protein*) (ROBINSON; BELL, 2007). Além disso, diferente aos eucariontes, o complexo MCM com função helicase desses organismos esta composta por um anel de seis subunidades proteicas idênticas entre si (SCHECHTER et al., 2000).

De modo geral, as archaeas apresentam características similares e parece ter uma versão simplificada dos componentes da maquinaria de replicação de eucariontes.

Tabela 1. Comparação dos cromossomas e de sua replicação nas bactérias, archaea e eucariontes.

	Eucarionte	Archaea
Topologia cromossomal	Linear	Circular
Número de cromossomos	Múltiplas	Um
Orígenes por cromossomo	Múltiplas	Uma, duas ou três
Reconhecimento da origem	Complexo ORC	Proteína Orc1/Cdc6
Helicase	Complexo MCM	Complexo MCM
Carregador da helicase	Proteína Orc1/Cdc6	Proteína Orc1/Cdc6
Braçadeira de deslizamento	Proteína PCNA	Proteína PCNA
Primase	Primase 1 e primase 2	Primase S e primase L
Principal DNA polimerase	Família polimerase B	Família polimerase B

1.2.2 Complexo de pré-replicação em tripanosomas

Os tripanosomas não apresentam um complexo ORC_{1-6} formado por seis proteínas e nem a proteína Cdc6, mas pesquisas de nosso laboratório mostraram uma sequência homologa tanto para a Orc1 como para a Cdc6, anotada no banco de dados como Orc1 e denominada por nosso grupo como “Orc1/Cdc6”. mostramos que de fato o complexo Orc1/Cdc6 é um componente importante da maquinaria de pré-replicação em *T. brucei* e em *T. cruzi* (GODOY et al., 2009). Nosso grupo mostrou também que nas formas replicativas de *T. cruzi* (epimastigotas e amastigotas), a proteína Orc1/Cdc6 apresenta uma ligação estável ao DNA em todo o ciclo celular; enquanto que nas formas infectivas (tripomastigotas e tripomastigotas metacíclicos) há uma fraca ligação entre a Orc1/Cdc6 e o DNA (dados submetidos à publicação).

Atualmente a bibliografia não mostra a presença de sequências homologas à proteína Cdt1 nos tripanosomas, mas assim como em leveduras estes organismos apresentam as seis subunidades que formam parte do complexo MCM_{2-7} (FORSEBURG, 2004).

Alem das proteínas mencionadas anteriormente, foi mostrado por DANG & LI (2011) a presença de uma nova proteína denominada de Orc1b, que interage com a proteína Orc1/Cdc6 em tripanosomas. Mais recentemente, Tiengwe et al., (2012) mostraram uma proteína homóloga à subunidade Orc4 do complexo ORC, ainda não descrita em tripanosomas que interage também com a Orc1/Cdc6. Pelos dados mostrados tem sido proposto que o complexo ORC esteja conservado nestes organismos e cabe a possibilidade de que existam os seis componentes do complexo ORC assim como nos outros eucariontes (**Figura 7**).

Figura 7 - Desenho esquematizado das diferenças do complexo ORC de leveduras e tripanosomas.

O complexo ORC em leveduras apresentam seis subunidades que se encontram interagendo com o DNA e com a proteína Cdc6. Já nos tripanosomas só está estabelecido até o momento a presença das proteínas Orc1/cdc6, a proteína Orc1b e a proteína Orc4. FONTE: TIENGWE et al., (2012).

1.3 Proteína Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)

A proteína GAPDH é uma enzima que participa na via glicolítica, cuja finalidade é a obtenção de energia que será usada para diversos processos biológicos. Nos últimos anos, várias são as pesquisas voltadas ao estudo da GAPDH em diversos processos não metabólicos, como abordado mais adiante.

1.3.1 Estrutura e função

Estruturalmente, a enzima GAPDH é um homotetrâmero formado por quatro subunidades monoméricas idênticas, onde cada monômero é composto por 356 resíduos de aminoácidos (**Figura 8A**), em células humanas, cada subunidade idêntica apresenta uma massa molecular de 37 kDa (SIROVER, 1999). Uma das funções principais desta proteína é no metabolismo, cuja participação é importante na via glicolítica e na gliconeogênese, participando do catabolismo e anabolismo de carboidratos, respectivamente. Esta enzima catalisa a fosforilação oxidativa do substrato gliceraldeído-3-fosfato (D-G3P) em 1,3-bisfosfoglicerato na presença do cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo em sua forma oxidada, o NAD^+ e fosfato inorgânico (Pi). De forma geral, a catálise começa com a ligação covalente entre o substrato D-G3P e o grupo sulfidrílico $-\text{SH}$ do resíduo de cisteína 166 (Cys166) presente no sítio catalítico da enzima, em seguida o cofator NAD^+ é reduzido, consequentemente uma molécula de NADH (forma reduzida) é liberada, deixando o sítio catalítico da enzima livre, onde liga-se outra molécula de NAD^+ . Desta forma, ocorre a formação do produto 1,3-bisfosfoglicerato e sua liberação juntamente com a enzima livre. No processo inverso, o NADH produzido pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase pode se manter ligado ao sítio catalítico da enzima até o momento de ser reoxidado pelo desvio do glicerol 3 fosfato. Após esse evento o NADH ligado é trocado por uma molécula livre de NAD^+ (**Figura 8B**) (BLATNIK et al., 2008).

Figura 8 - (A) estrutura quaternária da GAPDH de *Trypanosoma cruzi* CL Brener. (B) participação da GAPDH na reação metabólica.

FONTE: <http://www.pdb.org>

1.3.2 Regulação da GAPDH

Estudos mostram que a proteína GAPDH pode estar sobre regulação de moléculas como ATP, NAD⁺ e NADH, onde o ATP altera a conformação tetramérica da GAPDH ocasionando inibição na interação com outras moléculas (HUITOREL et al., 1985). Entretanto, a NAD⁺ e NADH participam na regulação da GAPDH no processo da catálise, onde um resíduo de cisteína no grupo ativo da GAPDH ataca o grupo carboxilo do gliceraldeído 3 fosfato (GAP), criando um intermediário hemitioacetil, logo depois, uma molécula fortemente ligada ao NAD⁺ aceita um íon H de GAP, formando NADH, GAP é concomitantemente oxidado a um intermediário tioéster utilizando uma molécula de água. A doação de íon H pelo hemitioacetil é facilitada pela desprotonação de um resíduo de histidina no sítio ativo da GAPDH, beneficiando a transformação do grupo carboxilo em tioéster com a liberação de um íon H, isto favorece a liberação de NADH do sítio ativo e é substituída por outra molécula de NAD⁺. Finalmente, uma molécula de fosfato inorgânico ataca na região do tioéster e forma um intermediário tetraédrico, que colapsa para liberar a 1,3- bisfosfoglicerato e o grupo tiol do resíduo de cisteína da GAPDH. Neste processo reversível o NAD⁺ é reduzido simultânea e endergonicamente para NADH (CANE; SOHNG 1994).

A proteína GAPDH pode ser regulada por modificações covalentes, ocasionadas por moléculas oxidantes que tem reatividade com o resíduo 152 de cisteína (Cys152) e o resíduo 166 de cisteína (Cys166) situados nas regiões catalíticas da enzima (FERSHT, 2002).

Vários fatores podem influenciar na atividade da proteína GAPDH, como o processo de S-nitrosilação ocasionado por níveis elevados de óxido nítrico, favorecendo a interação com a Siah1 (E3 ubiquitin ligase) (HARA et al., 2005; KORNBERG et al., 2010), outros

processos também podem influenciar na inibição de esta proteína como nitroalquilação causado por ácido graxos (BATTHYANY et al., 2006), oxidação originado por peróxido de hidrogênio ou peroxinitrito (SOUZA; RADI, 1998) e S-glutathionilação pela presença de glutatona ou óxido nítrico (MOHR et al., 1996). Já na presença de óxido nítrico a GAPDH funciona como sensor de estresse (HARA et al., 2006). Essas oxidações acima mencionadas afetam as funções glicolíticas da GAPDH, assim como funções não glicolíticas como visto no controle da apoptose que acontecem em culturas de neurônio provenientes do cerebelo (ISHITANI et al., 1998).

Sabe-se que a GAPDH é uma proteína redox dependente e esta relação pode influenciar nos processos onde esta proteína está envolvida. Pesquisas realizadas por ZHENG e colaboradores (2003) mostraram que a modulação da atividade OCA-S está relacionada pela razão celular $\text{NAD}^+:\text{NADH}$, este balanço funciona como regulador da interação do fator de transcrição Oct-1 com a GAPDH. Os autores observaram que a atividade de OCA-S aumenta quando a razão é baixa, além disso é favorecida a ligação do complexo OCA-S com o promotor H2B na presença de NAD^+ e inibida por NADH. Sugerindo então que a GAPDH poderia integrar o metabolismo energético e a regulação do ciclo celular já que coordena a transcrição da histona H2B.

1.3.3 Localização da GAPDH nuclear

Diferente do que se acreditava que GAPDH era uma proteína exclusivamente citoplasmática, estudos realizados nos últimos anos mostraram que essa proteína não se encontra apenas no citoplasma, mas também pode ser observado no núcleo da célula.

É pouco sabido como a GAPDH se encontra acumulada no núcleo. Uma forte hipótese defende a ideia que essa proteína seja translocada de um compartimento celular para outro, ou seja, a GAPDH viaja desde o citoplasma para o núcleo. Várias vertentes vêm sendo realizadas para determinar o mecanismo de como a GAPDH se desloca entre compartimentos, nesse contexto, BROWN e colaboradores (2004) mostraram a exportação nuclear mediada pela exportina-1 identificada na região C-terminal do domínio da GAPDH. Por outro lado, PARK et al., (2009) observaram que a acetilação (N-acetilglucosamina) da GAPDH provoca a sua denaturação, perdendo sua forma tetramérica, ocasionando a inibição da sua translocação nuclear.

1.3.4 A proteína multifuncional GAPDH

Além de sua função na via glicolítica, a proteína GAPDH de mamíferos desempenha funções importantes em outros processos celulares (**Figura 9**), que serão destacadas a seguir.

Figura 9 - Desenho esquematizando as funções não glicolíticas da proteína GAPDH nuclear (GAPDH_N).

(A) Participação na fusão de membrana, B) detecção de alterações estruturais de DNA, C) regulação da expressão do gene da histona H2B, e D) manutenção da estrutura de telômero. FONTE: SIROVER, (2005).

1.3.4.1 GAPDH na fusão da membrana nuclear

Sabe-se que para facilitar a fusão de membrana é necessária a participação de uma proteína que estimule a vesícula de fosfolípido induzindo os mecanismos que são necessários para a fusão de membrana (GLASER et al., 2002). A GAPDH é conhecida como uma proteína fusogênica, ou seja, pode associar-se a uma membrana fosfolipídica. Para verificar a participação da GAPDH na fusão de membrana nuclear, foi usado um soro auto-imune, a K199, que suprime fortemente a montagem da membrana nuclear *in vitro*. Neste estudo observou-se que a atividade de fusão nuclear suprimida por anticorpos foi recuperada na adição da proteína GAPDH. Por outro lado, quando foi inibida a GAPDH também foi inibida a fusão de membrana, sugerindo assim que a GAPDH cumpre um papel importante na fusão e montagem da membrana nuclear (NAKAGAWA et al., 2003).

1.3.4.2 GAPDH na interação com ácidos nucleicos

Recentemente, vários trabalhos mostraram que a proteína GAPDH pode associar-se a ácidos nucleicos. Foi identificado em células HeLa que a GAPDH apresenta ligação específica ao RNA de transferência (tRNA, e parece cumprir um papel na exportação do RNA (SINGH et al. 1993). Em *S. pombe* a RNA polimerase II (Pol II) esta associada com ao fator de transcrição TFIIF e a GAPDH participa desta associação. Mais que isto, a subunidade Rpb7 de Pol II interage com a proteína GAPDH em leveduras (MITSUZAWA et al., 2005).

1.3.4.3 GAPDH na regulação transcricional

Em mamíferos, foi encontrada outra função não glicolítica da GAPDH, como a de regulador transcricional, onde a proteína GAPDH faz parte do complexo OCA-S [(co-ativador da Oct-1 na fase S). Este complexo é um trans-ativador de fase S dependente do gene da histona H2B (ZHENG, 2003)]. Estudos funcionais envolvendo depleção de GAPDH mostraram a necessidade da subunidade GAPDH no complexo OCA-S na transcrição da histona H2B. GAPDH interage diretamente com o fator Oct-1, permitindo assim a interação do complexo OCA-S com Oct-1, que liga-se ao promotor (ZHENG 2003).

1.3.3.4 GAPDH na morte celular

Várias evidências apoiam que a GAPDH é uma proteína com função também no processo de apoptose. No processo de apoptose onde é gerado oxido nítrico, ocorre a perda da atividade catalítica da GAPDH e é estimulada a capacidade dessa proteína a ligar se a S1ah1 (E3-ubiquitina ligase sinal de localização nuclear). O complexo formado por GAPDH e S1ah1 transloca para o núcleo e medeia a morte celular. Também a GAPDH nuclear acetilada estimula a acetilação e atividade catalítica de p300/CBP. Consequentemente, as proteínas associadas a p300/CBP, assim como a p53, é ativada causando a morte celular. Esses dados sugerem que a GAPDH nuclear inicia uma cascata de morte celular através da p300/CBP (SEN et al., 2008).

1.3.4.5 GAPDH na manutenção na estrutura telomérica

Outra função da GAPDH que levantou interesse recentemente foi a de proteger o telômero em células de mamíferos. GAPDH é capaz de ligar-se a simples fita de DNA telomérico com alta especificidade *in vitro*. Esta interação ocorre via o domínio ligante de NAD^+ de GAPDH (DEMARSE et al., 2009). Mais que isto, GAPDH nuclear está envolvida na manutenção e/ou proteção de DNA telomérico (SUNDARARAJ et al. 2004).

1.4 O Telômero

Os telômeros são complexos formados por curtas sequências de DNA repetitivo não codificante que interagem com diversas proteínas, localizadas no término do cromossomo linear na maioria dos organismos eucariontes. Essas sequências são características de cada organismo (**Tabela 2**). O DNA telomérico (**Figura 10**) está formado por uma fita rica em G (guanina) e a outra fita rica em C (citosina), onde é apresentada na parte terminal da sequência de DNA uma prolongação correspondente à simples fita rica em G no sentido 3'. Esta estrutura é denominada como "3'G-overhang" (BLACKBURN, 2005). A principal função do telômero é proteger e manter a estabilidade estrutural do cromossomo, função que depende da sua estabilidade e manutenção do comprimento do DNA telomérico (SMOGORZEWSKA; DE LANGE, 2004).

Tabela 2 - Composição das sequências teloméricas presente nos diferentes organismos.

Espécies	Sequência telomérica
<i>Homo sapiens</i>	GGGTTA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	G_{1-3}T
<i>Trypanosoma brucei</i>	GGGTTA
<i>Oxyticha fallaxinova</i>	GGGGTTTT
<i>Tetrahymena thermophila</i>	GGGGTT
<i>Stylonychia lemnaelpustulata</i>	GGGGTTTT

FONTE: modificado de KURENOVA; MASON, (1997)

Figura 10 - Constituição do telômero.

FONTE: GREIDER; BLACKBURN, (1985).

É importante que cada célula mantenha o tamanho do DNA telomérico, mas em condições normais o telômero perde aproximadamente 50 pares de bases no seu extremo final a cada replicação de ciclo celular, isto por causa do problema final da replicação de DNA característico em eucariontes, onde o processo de replicação começa no centro e não em cada extremidade da fita de DNA. As DNA polimerases de DNA podem sintetizar DNA na direção 5' para 3' e só pode fazê-lo adicionando polinucleotídeos a partir de um primer de RNA, que é colocado em vários pontos ao longo do comprimento do DNA. Estes RNAs devem mais tarde ser substituídos por DNA. No entanto, a DNA polimerase não pode substituir o fragmento de RNA na posição 5' do DNA recém sintetizado. Quando não acontece a substituição para DNA, o fragmento de RNA é destruído por enzimas que degradam RNAs encontradas nos extremos da fita de DNA. Assim, uma parte do telômero é perdida durante cada ciclo de replicação na extremidade 5' da fita de DNA (ZHAO et al., 2009).

Depois de várias divisões celulares, as células com telômeros excessivamente encurtados ativam a resposta a dano de DNA, entrando em senescência (WRIGHT et al., 1989). Nesse sentido, o telômero sofre regulações com a finalidade de eliminar células envelhecidas do organismo antes de suportar mutações que podem ser manifestados nas seguintes replicações de DNA (BLACKBURN, 2000).

1.4.1 Estrutura

A presença das proteínas teloméricas favorece a formação de estruturas que ajudam na proteção do telômero contra o desgaste excessivo no transcurso dos ciclos celulares. Este desgaste leva a inibição da função protetora do cromossomo, originando instabilidade genômica, fusão ou perda de cromossomos. As células que apresentam esses defeitos, não só

são incapazes de duplicar se, mas também deixam de ser viáveis, ativando-se o processo de apoptoses ou morte celular programada (BLACKBURN, 1991).

Entre as estruturas com função protetora de telômero temos, a “G-quadruplex” (**Figura 11A**), formado pelo empilhamento de guanidina, essa estrutura é controlada pela associação das proteínas com a simples fita telomérica rica em G (HUPPERT, 2010). Outra estrutura característica em telômeros é conhecida como “T-loop” (**Figura 11B**), essa estrutura é formada quando a fita simples rica em G telomérica invade a dupla fita, ocasionando um pareamento com a fita C, assim formando uma volta na extremidade do telômero (DE LANGE, 2004). A estrutura de “T-loop” permite que proteínas se liguem as duas simples fitas de DNA na estrutura formada, providenciando assim bases para mecanismos de regulação adicional (LITMAN et al., 2012). Cabe mencionar que a presença de “T-loop” foi observada em células de mamíferos, alguns ciliados e nos tripanosomatídeos (DE LANGE, 2004; MUÑOZ-JORDAN et al., 2001; MURTI; PRESCOTT, 1999;).

Figura 11 - Esquematização das estruturas protetoras do telômero. A) Estrutura “G-quadruplex” e B) Estrutura “T-loop”.

FONTE: OGANESIAN; BRYAN, (2007).

1.4.2 Proteínas que protegem o telômero

Os telômeros precisam ser duplicados em cada divisão celular pela maquinaria de replicação, mas também necessitam estar protegidos por uma capa de proteínas para permanecerem estáveis. Desta maneira, assim a célula pode coordenar a replicação de DNA e a proteção do telômero frente a qualquer dano (FLYNN et al., 2012).

Essa associação entre várias proteínas e o DNA telomérico permite proteger o terminal cromossômico e regular a atividade da enzima telomerase (DIMITRIEV et al., 2003). A

enzima telomerase adiciona as sequências específicas e repetitivas de DNA à extremidade 3' dos cromossomos, sequências estas que são perdidas durante o processo de replicação. (BLACKBURN; GREIDER, 1987; SMOGORZEWSKA; DE LANGE, 2004). O complexo proteico ligado ao DNA telomérico pode estar distribuído de duas formas: (i) a forma “capped” ou “closed” (figura 12A) refere-se quando o telômero se encontra protegido por um complexo proteico ou por um rearranjo estrutural. Nesta forma a função da telomerase permanece inibida; (ii) e a “uncapped” ou “open” (figura 12B), quando o telômero se encontra desprotegido pela falta de alguma proteína do complexo que desestabiliza o telômero, permitindo o ingresso da telomerase ativa, a qual pode alongar a fita rica em G (DE LANGE, 2005).

Figura 12 - Formas (A) “capped” e (B) “uncapped” do telômero associado a complexos proteicos.

FONTE: O’SULLIVAN et al, (2010).

O conjunto de proteínas que protegem o telômero para assegurar a integridade do cromossomo é denominado de complexo “shelterin”. Em células de mamíferos o complexo shelterin é formado por seis proteínas: TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 e POT1; onde a proteína TRF1 (*telomere repeat binding factor 1*) se liga à dupla fita de DNA telomérico com alta especificidade. Vários aspectos desse complexo são altamente conservados, existindo similaridade entre as proteínas de diferentes organismos (**Figura 13**). As proteínas POT1 e TPP1 de vertebrados são homólogos às proteínas TEBP α e TEBP β que se encontram presente nos ciliados, e fortes evidências indicam que ambas proteínas são conservadas em *Saccharomyces pombe* (MIYOSHI et al., 2008). A proteína TRF like também pode ser encontrada em *S. pombe* e *Trypanosoma brucei* (BILAUD et al., 1997; LI et al., 2005).

Figura 13 - Comparação das proteínas do complexo shelterin em diversos organismos eucarióticos.

FONTE: PALM; DE LANGE, (2008)

A proteína TRF1 (*telomere repeat binding factor 1*) se liga à dupla fita de DNA telomérico com alta especificidade. A proteína TRF2, parálogo da TRF1, também interage com a dupla fita de DNA telomérico e cumpre a função de proteger a simples fita 3' do telômero. Em células que sofrem inibição ou sub-expressão da proteína TRF2 foi observada uma rápida indução de apoptose mediada pela proteína p53 (DE LANGE, 2002).

Diferente das TRFs, a proteína POT1 tem preferência para interagir com a simples fita de DNA telomérico 3', mas cumpre também a função de proteger o telômero na região terminal. Essa proteína serve também como um regulador da estabilidade do comprimento do telômero, prevenindo a elongação pela telomerase (WU et al., 2006).

Pouco ainda é conhecido das proteínas que interagem com o DNA telomérico em tripanosomas, LI et al. (2005), identificaram e caracterizaram em *T. brucei* a proteína TRF(tbTRF). Esta proteína é homóloga a TRFs de vertebrados. Além disso, os autores demonstraram que essa proteína é componente do complexo telomérico durante todo o ciclo de vida nesse parasita.

Apesar da divergência evolutiva entre os tripanosomatídeos e vertebrados, os telômeros desses organismos estão constituídos pela mesma sequência 5' TTAGGG 3' e a

função de alongamento dessa sequência é realizada também pela telomerase (BLACKBURN; CHALLONER, 1984; CANO et al., 1999).

1.5 Interação entre a GAPDH e o Telômero

Como foi mencionado anteriormente, a proteína GAPDH se associa com o DNA telomérico em células humanas para cumprir a função de proteção do telômero contra o encurtamento provocado pelo composto tóxico ceramida (SUNDARARAJ et al., 2004).

Outro estudo que mostra que a GAPDH interage com o DNA telomérico foi o mostrado por DEMARSE et al. (2009). Células humanas induzidas com agentes quimioterapêuticos apresentaram um aumento da quantidade de GAPDH nuclear. Mais que isto, a presença de GAPDH confere proteção contra degradação do DNA telomérico. Nesse estudo também foi apresentada a estequiometria da interação entre a GAPDH e o telômero (**Figura 14**), mostrando que existe uma razão de 1:2 para a interação GAPDH:DNA. Esses resultados demonstram que GAPDH liga ao DNA telomérico in vitro e pode ter um papel biológico na proteção dos telômeros em resposta a agentes quimioterapêuticos nesses tipos celulares.

Figura 14 - Modelo do complexo entre GAPDH e DNA telomérico humano.

(A) representação da superfície isoeletrica da GAPDH, onde o vermelho é carregado negativamente, o azul é positivo, e branco é descarregada. (AS) indica os sítios ativos. (B) Mesma representação como em (A), mas com giro de 90°. (C) Modelo de uma molécula de 18 nucleotídeos de DNA, mostrando em laranja a sequência de reconhecimento GGT e em verde encontram-se as bases que não são necessárias para a ligação. São mostradas as distancias entre os sítios ativos mostrados em (A). (D) Oligonucleotídeo ancorado na superfície da GAPDH, mostrando a sobreposição da sequencia GGT nos sítios ativos. FONTE: DEMARSE et al., (2009).

2.1 **Objetivos gerais**

- I Buscar novas possíveis proteínas presentes na maquinaria de pré-replicação de *Trypanosoma cruzi*.
- II Caracterizar a possível interação entre GAPDH e o DNA telomérico em *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*.

2.2 **Objetivos específicos**

- I
 - Purificar a proteína Orc1/Cdc6 de formas epimastigotas de *T.cruzi*.
 - Analisar as proteínas co-purificadas com Orc1/Cdc6 de *T. cruzi*.
- II
 - Verificar se GAPDH interage com DNA telomérico em *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*.
 - Analisar estruturalmente a interação entre a proteína GAPDH de *T. cruzi* e o DNA telomérico.
 - Avaliar o possível papel do balanço NAD^+/NADH no controle da interação proteína-DNA telomérico nos tripanosomas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Parasitas

A forma epimastigota de *T. cruzi* (cepa Y) foi mantida em meio LIT complementado com soro bovino fetal ao 10 % e hemina ao 0,1 % (10 mg/mL dissolvida em 0,1 M de trietanolamina) a 28 °C (SCHENKMAN et al., 1994). Nesta mesma temperatura a forma procíclica de *T. brucei* (cepa 427) foi mantida em meio SDM 79 suplementado com soro bovino fetal ao 10 % e hemina ao 0,3 % (2,5 mg/mL dissolvida em 0,1 M de trietanolamina). Os parasitas transfectados com TAP-tag (controle) e TAP-tag-Orc1/Cdc6 foram mantidos em meio de cultura suplementado com 40 ug/mL de geneticina 418 (G418).

3.2 Tripomastigotas de cultura de células

Células LLCMK2 (ATCC®) foram cultivadas em garrafas de 150 cm² contendo meio DEMEM suplementado com soro fetal bovino ao 10 % (GIBCO®), penicilina 100 µg/ml, estreptomicina 25 µg/ml a 37 °C com 5 % de CO₂. Ao atingirem a confluência (80 % a 100 %) realizou-se a passagem através de tripsinização e foi feito um inóculo de 2 x 10⁵ células/mL para cada nova garrafa de 150 cm². Após 24 horas, estas células (50 % – 70 % de confluência) foram infectadas com 1x10⁷ células das formas tripomastigotas. Após 96 horas de contato, os parasitas livres no sobrenadante foram retirados com a troca do meio DEMEM. Após 120 horas do contato inicial ocorreu o pico de liberação das formas tripomastigotas. Foi feita uma troca de meio de cultura. Após mais 24 h, as formas tripomastigotas foram então obtidas.

3.3 Obtenção do Extrato diferencial de Trypanosoma

O extrato diferencial foi obtido a partir de 1x10⁸ células/mL de células. Os parasitas, obtidos por centrifugação a 6000 rpm por 3 minutos, foram lavados por 2 vezes com PBS 1X nas mesmas condições de centrifugação. O sedimento foi ressuspensão em 100 µL de tampão de lise CSK (1 M de Tris-HCl pH 7,4; 5 M de NaCl; 1 M de Sacarose; 1 M de MgCl₂; 200 mM de fluoreto de sódio; 200 mM de ortovanadato de sódio; 0,1 % de triton; 100 mM de PMSF e inibidores de proteases) e incubado por 10 minutos a 4 °C sobre agitação. Seguidamente a amostra foi centrifugada a 6000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante resultante foi separado num novo tubo coletor, chamando-se a esta fração de “fração solúvel

1”. O precipitado foi novamente ressuspenso com 100 µL de CSK e incubado sobre agitação por 10 minutos a 4 °C, seguido de centrifugação a 6000 rpm por 2 minutos, este novo sobrenadante foi chamado de “fração solúvel 2”. O sedimento resultante após a lise com CSK foi ressuspendido em 100 µL de uma solução de DNase (50 µL de enzima DNase (50 u); 10 µL tampão da enzima e 40 µL de H₂O milliq.) e incubado a 37 °C por 30 minutos. Após esse tempo a amostra foi centrifugada a 6000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante transferido a um tubo novo, chamando-se a esta fração de “DNase 1”. O precipitado foi novamente ressuspendido em 100 µL de solução de DNase e incubado a 37 °C por 30 minutos. Finalmente, o material foi centrifugado nas mesmas condições acima e o sobrenadante assim obtido foi separado num novo tubo coletor, chamando-se a esta fração de “DNase 2”. Uma alíquota de 20 µL de cada fração foi misturada com 20 µL de tampão de amostra 2X, fervidas e submetidas a SDS-PAGE. Os géis foram corados com *coomassie blue* ou utilizados para o ensaio de *western blotting*.

3.4 Transfecção dos Parasitas

Para a transfecção dos parasitas se usaram culturas de *T. cruzi* (em fase logarítmica de crescimento) cultivadas em meio LIT. O número de parasitas utilizados para cada transfecção foi de 4×10^7 células/mL. Para este procedimento, os parasitas foram centrifugados por 5 minutos a 6000 rpm., o sedimento formado foi lavado com PBS 1X estéril por duas vezes consecutivas e centrifugado nas mesmas condições acima descritas. Os tripanosomas lavados foram ressuspenso em 0,4 mL de solução de eletroporação (NaCl 140 mM; HEPES ácido 25 mM; Na₂HPO₄ 0,74 mM) e transferidos para a cubeta de eletroporação de 0,2 cm previamente resfriada a 4 °C. Adicionou-se então 100 µg de DNA (construção gênica que esta disponível em nosso laboratório contendo a sequência que codifica para Orc1/Cdc6 de *T. cruzi* que foi clonado no vetor pTex-TAP tag).

Após 10 minutos no gelo, as cubetas foram submetidas à eletroporação, usando 2 pulsos de 450 V e 500 µF, seguidamente as cubetas foram incubadas por 10 minutos no gelo. Após esse tempo, os parasitas foram transferidos para garrafas de cultura de 25 cm² contendo 10 mL de meio LIT seguido de incubação a 28 °C. Após 24 horas foi adicionado 250 µg/mL de gentamicina G418, aumentando-se a concentração do antibiótico para 500 µg/mL após 72 horas de incubação. O monitoramento das culturas foi feita através da contagem celular em

câmara de Neubauer, em intervalos de 5 dias por um período que varia entre 10 e 20 dias para obtenção da de células resistentes).

3.5 *Preparação dos extratos dos parasitas transfetados*

Foram usadas culturas de *Trypanosoma cruzi* em fase logarítmica de crescimento. A Cultura contendo 1×10^7 células/mL foi centrifugada a 6000 rpm por 3 minutos, e as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1X. Após última centrifugação foi adicionado ao sedimento obtido 250 µL tampão de amostra para SDS-PAGE. A mistura foi agitada em *vortex*, incubadas por 5 minutos a 99 °C, logo colocadas em gelo por 2 minutos, seguido de agitação e centrifugação a 13200 rpm por 2 minutos. O sobrenadante obtido foi aplicado no gel de poliacrilamida.

3.6 *Ensaio de Western Blotting*

Os testes de *western blotting* foram obtidos a partir de SDS-PAGE com acrilamida ao 10 %. Os géis foram carregados com extratos proteicos equivalentes a 1×10^7 células/mL e a corrida realizada a 220 V por 45 minutos. Finalizada a migração das proteínas no gel procedeu-se à transferência dos mesmos para a membrana de nitrocelulose. Esta transferência foi realizada envolvendo-se a cuba num sistema gelado a 400 mA por 50 minutos. Após transferência, a membrana foi incubada sobre agitação na solução de bloqueio (PBS 1X, tween20[®] 0,1 % e leite em pó MOLICO[®] a 5%), por 1 hora, seguido de lavagem com PBS 1X e tween20[®] 0,1 % por 10 minutos. A partir desta etapa, todas as incubações com as consecutivas lavagens foram feitas sobre agitação. A membrana foi incubada como anticorpo primário anti-Orc1/Cdc6 de coelho diluído 1:1000 (GODOY et al., 2009), anti-GAPDH de camundongo diluído 1:1000 (SILBER et al., 2009), anti-histona H4 de camundongo diluído 1:1000 (DA CUNHA et al., 2006) ou anti-HSP70 de camundongo diluído 1:10000 (BANGS et al., 1993) em PBS 1X e tween20[®] 0,1 % por 1 hora a 37 °C. Passado esse tempo, a membrana foi lavada por três vezes nas mesmas condições de lavagem acima citadas, seguido de incubação com anti-imunoglobulina de coelho (anticorpo secundário) conjugado a peroxidase diluído 1:1000 em PBS 1X e tween20[®] 0,1 % por 1 hora a 37 °C. Após este período procedeu-se as três últimas lavagens da membrana de nitrocelulose. A revelação foi

realizada utilizando-se o Kit de quimioluminescência (Millipore®) seguindo as indicações do fabricante.

3.7 Obtenção de extrato protéico e purificação protéica por TAP tag

Para a obtenção do extrato proteico, foram usadas culturas contendo 3×10^{10} células/mL da cultura transfectada de *T. cruzi* em fase logarítmica de crescimento. Os parasitas foram obtidos por centrifugação a 6000 rpm por 3 minutos e o precipitado lavado por 2 vezes com PBS 1X nas mesmas condições de centrifugação. O sedimento celular foi ressuspenso em 1,5 mL de **tampão A** (10 mM de HEPES pH 7,5; 1,5 mM de $MgCl_2$; 0,5 mM de ditioneitol (DTT) e 10 mM de KCl) e incubado por 10 minutos em gelo. Após este período foi adicionado à mistura 10 μ L de NP-40 10 % e 80 μ L inibidores de protease (Roche®). A amostra foi incubada por 1 hora em gelo e sonicada uma única vez na potência 2 por 15 segundos. Após sonicação, adicionou-se 3,75 mL de **tampão B** (10 mM de HEPES pH 7,5; 3,3 mM de $MgCl_2$; 10 mM de KCl e 2 M de sacarose) e centrifugou-se a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante da centrifugação foi usado para a primeira etapa de purificação que descreveremos a seguir:

- Ligação da **proteína A** na coluna de esferas de IgG (*IgG Sepharose*, Amersham®): Na coluna previamente equilibrada com **tampão A**, foram misturados 2 mL de resina de IgG e 5 mL do sobrenadante resultante da etapa anterior, por 3 horas a 4 °C e com agitação. Em seguida, para a remoção de contaminantes, a coluna foi lavada três vezes por 5 minutos a 4 °C em agitação com o mesmo tampão. A coluna resultante foi equilibrada com tampão da TEV protease (50 mM de Tris-HCl; 0,5 mM EDTA e 1 mM de DTT).
- Digestão do sítio TEV: a coluna de sepharose IgG foi incubada sob agitação por 16 horas a 4 °C com 10 mL de tampão TEV e 100 unidades da enzima TEV protease (Invitrogen®). O eluído resultante da digestão foi obtida por centrifugação a 4000 rpm por 2 minutos e colocada num tubo novo coletor. O produto eluído foi separado por SDS-PAGE, visualizado por coloração *Comassie Blue* e analisado por espectrômetro de massa.

3.8 Ensaio de Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)

Foram usados extratos de *Trypanosoma cruzi* (formas epimastigotas e tripomastigotas) e extratos de *Trypanosoma brucei* (forma procíclica) em uma densidade de até 1×10^7 células/mL de cultura em fase logarítmica. Os parasitas foram coletados por centrifugação a 6000 rpm por 15 minutos a 10 °C e ressuspensos em 50 mL de PBS 1X pH 7,5. Para a fixação dos parasitas foi adicionado formaldeído a uma concentração final de 1% e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente, sobre agitação. Para interromper a fixação, foi adicionado glicina (125 mM) por 5 minutos. O material ressuspensionado foi centrifugado a 6000 rpm por 15 minutos a 10 °C e lavados uma vez com PBS 1X gelado contendo glicina 125 mM e mais 2 vezes só com PBS 1X gelado. O sedimento resultante foi ressuspensionado em 1 mL de *tampão de lise da ChIP* (50 mM de HEPES pH 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1 % de deoxicolato sódico; 1 % de NP-40; 1 mM de PMSF e inibidores de proteases) e sonificado 8 vezes por 10 segundos cada um em banho de gelo, com intervalos de 1 minuto entre os pulsos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 30000 rpm por 40 minutos a 4 °C e o sobrenadante resultante foi utilizado para a imunoprecipitação.

À amostra obtida após sonicação foi adicionado anticorpo anti-GAPDH numa proporção 1:800 e incubada durante 2 horas a 4 °C sobre agitação. Depois o material foi centrifugado a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C e colocado num tubo novo contendo 40 µL de resina de proteína G sepharose previamente tratada com BSA (albumina de soro bovino) na concentração de 5 mg/mL por 2 horas a 4 °C com agitação. Após esse tempo, a amostra foi lavada duas vezes com 1 mL de *tampão de lavagem de ChIP* (10 mM de Tris-HCl pH 8; 250 mM de LiCl; 0,5 % de dioxicolato sódico; 1 mM de EDTA e 0,5 % de NP-40) e por 2 vezes com TE (10 mM de Tris-HCl pH 8 e 1 mM de EDTA). Para reverter a ligação proteína-DNA, a cromatina imunoprecipitada foi eluída adicionando 250 µL de *tampão de eluição* (50 mM de Tris-HCl pH 8; 10 mM de EDTA e 1 % de SDS) e incubada a 65 °C por 16 horas sob agitação (400 rpm). O DNA obtido foi então purificado com fenol clorofórmio.

3.9 Extração de DNA usando fenol clorofórmio

A amostra contendo DNA foi colocada num tubo novo e em seguida foi adicionado o *tampão de eluição* “TE” até completar um volume de 300 µL. A este volume foi acrescentado o mesmo volume de fenol, seguido de agitação em vortex. A amostra obtida foi centrifugada a

13000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante aquoso foi recolhido para um tubo novo. A este sobrenadante adicionou-se 10 % de acetato de sódio 3M e etanol absoluto gelado num volume de 3,5 do total extraído. O material resultante foi incubado por 1 hora em gelo seco. Após esse período a amostra foi centrifugada a 13000 rpm por 10 minutos e lavada com etanol ao 70 % nas mesmas condições de centrifugação, finalmente após secagem (65 °C por 10 minutos), a amostra foi ressuspensa em 20 µL de TE.

O DNA produto da ChIP foi aquecido a 90 °C por 5 minutos e seguidamente incubado por 5 minutos no gelo. Após esse tempo se realizou um *cross-linking*, colocando o produto em uma membrana de nylon com luz ultravioleta (UV) por 15 minutos. A membrana foi incubada em UV por mais 3 minutos com a solução SSC (10X) (1,5 M NaCl; 0,15 M de citrato de sódio a um pH de 7,0). A membrana obtida foi hibridizada com sonda de telomero, marcada previamente com fosfatase alcalina (GE®) e para a detenção da quimioluminescência, a membrana foi revelada com o *kit* (GE®). seguindo as instruções do fabricante.

3.10 Obtenção do DNA telomérico usado como sonda na hibridização

As bactérias contendo o DNA plasmidial (pTel) com as sequencias teloméricas foram incubadas em meio LB solido (acrescentado com 100mg/mL de ampicilina) a 37 °C por 12 horas. As colônias crescidas foram inoculadas em meio LB liquido contendo a mesma concentração de ampicilina acima mencionado e incubados a 37 °C sob agitação por 12 horas. Após esse tempo foi extraído o DNA plasmidial por meio do Kit *Wizard® plus Minipreps DNA Purification System* (Promega), seguindo as especificações do fabricante. O DNA obtido foi digerido com duas enzimas de restrição *Bam* HI e *Hind* III. O fragmento correspondente ao DNA telomérico (147 pb) foi purificado pelo kit *Silica Bead DNA Gel Extraction Kit®* (Thermo Scientific), e quantificado por Nanodrop® (Thermo).

3.11 Proteína recombinante Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)

A proteína recombinante GAPDH (cedida pelo Professor Dr. Otavio Thiemann da USP São Carlos) foi utilizada para os ensaios de *Band shift* (EMSA). A purificação e atividade da proteína rGAPDH de *Trypanosoma cruzi* esta descrita em Freitas et al., (2009) e Silva et al., (2010).

3.14 Obtenção dos oligonucleotídeos de dupla fita

Para a obtenção da dupla fita de oligonucleotídeos marcados foi feito uma mistura dos 2 oligos complementares numa razão molar de 1:1 com o tampão TEN, esse material foi incubado por 10 minutos a 95 °C. Após esse tempo, o material foi esfriado lentamente a temperatura ambiente e a dupla fita foi marcada seguindo o procedimento acima descrito.

3.15 Interação proteína/DNA

Para a interação proteína-DNA usou-se os oligonucleotídeos de telômero marcados na etapa anterior e a proteína recombinante GAPDH numa concentração inicial de 1 µg. Este ensaio foi realizado com o *kit Dig Gel Shift* (Roche®), seguindo as instruções do fabricante. Foram feitas as seguintes misturas em gelo (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Mistura de reagentes para reação de interação da proteína GAPDH e o oligonucleotídeos previamente marcado.

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
<i>Binding buffer</i> (µL)	4	4	4	4	4
<i>Poly[d(I-C)]</i> (µL)	1	1	1	1	1
<i>Poly L-lysine</i> (µL)	1	1	1	1	1
<i>Oligo labeled</i> (µL)	1	1	1	1	1
<i>Prot GAPDH</i>	--	1 µg	100 ng	10 ng	1 ng

Os tubos foram completados com água para um volume final de 20 µL e em seguida foram deixados no gelo por 15 minutos. As amostras foram corridas num gel de acrilamida: 250 µL de tampão TBE 10X (890 mM de Tris-HCl; 890 mM de ácido bórico; 20 mM de EDTA, pH 8,0); 2 mL de acrilamida 30 %; 16 µL de TEMED® e 200 µL de APS (persulfato de amônio) e a mistura foi completada com água bidestilada para um volume final de 10 µL. Usou-se como tampão de corrida TBE 0,25X, a 80 V por 1 hora e 15 minutos. Depois da corrida as amostras foram transferidas para uma membrana de nylon, usando como tampão de transferência TBE 0,25X, a 400 mA por 30 minutos. A membrana foi fixada com luz ultravioleta (UV) por 15 minutos como acima descrito. Após esse tempo, a membrana foi colocada em solução 10X de SSC e mantida em UV mais 3 minutos. Para a detecção da quimioluminescência, a membrana foi revelada com o *kit Dig Gel Shift* (Roche®), segundo as instruções do fabricante.

3.16 Competição da interação proteína/DNA

Para testar a especificidade da interação proteína-DNA foi realizada uma competição com oligonucleotídeos frios (não marcados). Usamos para isso, os oligonucleotídeos de simples fita de telômero marcados e um oligonucleotídeo de mesmo tamanho (CGGGCCGCATGGACAGAGATTCACTTGTGG), como controle inespecífico. Este ensaio foi realizado com o *kit Dig Gel Shift* (Roche®), seguindo as instruções do fabricante. Foram feitas as seguintes misturas no gelo (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Mistura de reagentes para reação de competição na interação da proteína GAPDH e o oligonucleotídeos previamente marcado.

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
<i>Binding buffer</i> (μL)	4	4	4	4	4
<i>Poly[d(I-C)]</i> (μL)	1	1	1	1	1
<i>Poly L-lysine</i> (μL)	1	1	1	1	1
<i>Oligo labeled</i> (μL)	1	1	1	1	1
<i>Oligo unlabeled</i>	--	--	50 pmol	500 pmol	50000 pmol
<i>Prot. GAPDH</i> (μg)	--	1	1	1	1

Os tubos foram completados com água para um volume final de 20 μL e em seguida foram deixados no gelo por 15 minutos. As amostras foram corridas num gel de acrilamida, depois foram transferidas para uma membrana de nylon e detectados por quimioluminescência da mesma forma que na etapa anterior.

3.17 Quantificação de NAD⁺/NADH

Para a obtenção do extrato celular para a quantificação de NAD⁺/NADH intracelular foram usadas $2,4 \times 10^7$ células/mL da cultura de *T. cruzi* (formas epimastigota e tripomastigota) e de *T. brucei* (forma procíclica) em fase logarítmica de crescimento. Os parasitas foram obtidos por centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos e o precipitado lavado por 2 vezes com PBS 1X nas mesmas condições de centrifugação. O sedimento celular foi ressuspenso em 400 μL da solução *NAD⁺/NADH extraction buffer* (BioVision®), e incubado em gelo seco por 20 minutos. Após esse tempo, foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Logo após, a amostra foi homogenizada usando *vortex* por 10 segundos. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes transferidos para tubos novos de 1,5 mL. Seguidamente procedeu-se o ensaio de quantificação utilizando-se o

protocolo de *NAD⁺/NADH Quantification Kit* (BioVision®) seguindo as indicações do fabricante.

3.18 Espectrometria de Massa

As amostras da fração de proteínas associadas ao DNA (obtidas a partir do extrato diferencial dos parasitas provenientes da cultura de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*) e as amostras derivadas da purificação com de Orc1/Cdc6 fundida ao epitopo TAP tag foram tratadas para uma digestão tripsínica em solução. A solução protéica foi secada em *speed vacuum* e logo foi ressuspensa no tampão 1 (6 M de uréia e 100 mM de Tris-HCl). Foram aliqüotados 100 µL da suspensão, contendo 120 µg de proteína total, em seguida foi adicionado 5 µL do agente redutor (200 mM de DTT e 100 mM de Tris-HCl), misturados homogeneamente e incubados por 1 hora e 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse tempo, foram acrescentados 20 µL do agente alquilante (200 mM de Iodoacetamida (IAA) e 100 mM de Tris-HCl), misturado gentilmente e incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 20 µL do agente redutor para consumir a IAA que não reagiu na etapa anterior e incubado por mais 1 hora a temperatura ambiente. Depois da incubação, reduzimos a concentração da uréia para 0,6 M (concentração que a tripsina se mantém ativa) diluindo a mistura com 775 µL de água milliQ. Adicionou-se a tripsina numa proporção de protease:substrato de 1:50 (M:M) e o produto foi misturado e incubado por 16 horas a 37 °C. Para interromper a reação da solução o pH foi mudado para 6 usando ácido acético concentrado. O material foi secado em *speed vacuum* e a retirada de sais e uréia foi realizada usando *Sep-Pack C18* (Waters). Seguidamente procedeu-se a secar a amostra e o produto seco foi ressuspensa em 0,1 % de ácido fórmico.

As amostras obtidas na etapa anterior foram submetidas a análise em MS/MS e realizadas no instrumento MALDI-ToF/Pro (Amersham), utilizando corridas de duas horas e fragmentação dos 10 íons mais intensos. As amostras em solução foram misturadas na proporção 1:1 com uma solução supersaturada de matriz para peptídeos (ácido cinâmico) ou matriz para proteínas (ácido sináptico), depositadas sobre a placa de amostragem (0,4 – 0,8 µl) e secadas a temperatura ambiente. Foi utilizado o modo automático de controle do equipamento e aquisição de dados do software de controle do equipamento. Para PMF (*peptide mass fingerprint*) os íons detectados foram analisados pelo banco de dados local

(pertencente ao software de controle e aquisição de dados) e pelos bancos de dados públicos disponíveis na Internet.

3.19 *Análise de citometria de fluxo (FACs)*

As células foram lavadas com PBS e fixadas com 50% de etanol em PBS por 10 min a 4 °C. As células foram lavadas novamente com PBS e ressuspensas em PBS contendo 20 mg/mL de iodeto de propidium. As células foram então analisadas com um citômetro de fluxo (Becton Dickinson-Excalibur).

3.20 *Análise computacional da interação GAPDH e DNA telomérico em T. cruzi*

Foram usados 359 aminoácidos da GAPDH em *T. cruzi* (número de acesso XP_812137.1; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os domínios conservados da GAPDH foram analisados usando o programa *Conserved Domain Architecture Retrieval Tool* acessível no site do NCBI. O alinhamento das sequências foi realizada usando o programa *ClustalX* (THOMPSON et al., 1997). Para alinhar a estrutura foi utilizado o método de extensão combinatória (SHINDYALOV; BOURNE, 1998) e o estabelecimento da sobreposição dos pilares estruturais de ortólogos da GAPDH foi realizado através do programa PyMOL (DELANO, 2002). A estrutura de raios X da GAPDH de *T. cruzi* em complexo com o inibidor irreversível iodoacetato foi depositado no *Protein Data Bank* com o código PDB 3DMT. A cadeia A (GUIDO et al., 2009) apresenta uma resolução de 2,3 Å, a qual foi utilizada para realizar a análise do encaixe do substrato pelo programa *ZDOC Protein Docking Servidor Web* 3.0.2/2.3.2 (PIERCE et al., 2011), gerando dez possibilidades de encaixe para cada ligante, onde um evento positivo foi identificado e delimitado pelos domínios protéicos laterais. O modelo de análise, as interações de resíduos e comparações com outras enzimas vinculadas a NAD⁺ foram realizadas utilizando o programa PyMOL (DELANO, 2002).

Os resultados obtidos no presente trabalho serão apresentados separadamente em duas partes:

4.1 Possíveis proteínas associadas à Orc1/Cdc6 em *Trypanosoma cruzi*

4.1.1 Enriquecimento de Orc1/Cdc6 em frações celulares para a análise por espectrometria de massa

A replicação do DNA em eucariontes começa com a formação do complexo de pré-replicação é composto pelo complexo ORC₁₋₆, a proteína Cdc6, a proteína Cdt1 e o complexo Mcm₂₋₇ (ROBINSON; BELL, 2005).

Os tripanosomas não apresentam um complexo ORC formado por seis proteínas, mas uma proteína homóloga tanto para a Orc1 como para a Cdc6, denominada por nosso grupo como “Orc1/Cdc6”, é um componente importante da maquinaria de pré-replicação em *T. brucei* e em *T. cruzi* (GODOY et al., 2009).

Estas descobertas nos levaram a buscar possíveis proteínas que estariam formando parte do complexo de pré-replicação em tripanosomas. Sabendo que o complexo Orc1/Cdc6 interage com o DNA (GODOY et al., 2009), nos propusemos obter uma porção celular rica em Orc1/Cdc6 para análise em espectrometria de massa. Para isso foi padronizado por nosso grupo um tratamento celular ao qual nos denominamos “extração diferencial” que permite a obtenção de proteínas ligadas ao DNA (GODOY et al., 2009). A primeira etapa do método consiste em utilizar tampão de lise para romper a membrana dos parasitas a fim de se obter todas aquelas proteínas que se encontram dispersas no interior celular, ou seja, as proteínas solúveis (fração solúvel 1 e 2). Na segunda etapa, o pellet resultante é tratado com solução contendo DNase para quebrar as fitas de DNA, liberando todas aquelas proteínas associadas ao DNA, entre elas a proteína Orc1/Cdc6 (frações DNase 1 e 2). Assim, as proteínas obtidas, partindo de 1×10^8 células, a partir de cada extrato resultante foram submetidos a SDS-PAGE. Como se observa na **Figura 15A**, a fração solúvel apresenta maior quantidade de proteínas quando comparado com a fração insolúvel (frações DNase). Ao decidir avaliar as frações DNase 1 e DNase 2 por espectrometria de massa não foi possível detectar a Orc1/Cdc6. Uma vez que a amostra é centrifugada antes de ser passada no aparelho, nós investigamos se Orc1/Cdc6 poderia ficar presa no pellet e, portanto não estar sendo submetida a análises de espectrometria de massa. Para tanto, uma nova fração DNase 2 foi centrifugada e o pellet e

sobrenadante obtidos foram analisados por *western blotting* utilizando-se anticorpo policlonal anti-Orc1/Cdc6 (**Figura 15B**), comprovando que de fato a Orc1/Cdc6 fica retida no pellet com este procedimento.

Figura 15 - Frações celulares obtidas a partir do extrato diferencial

(A) Fração solúvel 1 e 2 e fração insolúvel (DNase 1 e 2) foram submetidas a SDS-PAGE e corado com o *Comassie Blue*. (B) A fração solúvel 2 foi centrifugada e tanto o pellet como o sobrenadante obtido foram submetidos a SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose e detectados com anticorpo anti-Orc1/Cdc6. A banda mostrada pela seta corresponde ao tamanho esperado de Orc1/Cdc6 (49 KDa).

Para resolvermos esta questão, adotamos um novo procedimento. A fração DNase 2 foi centrifugada e tanto o pellet como o sobrenadante foram submetidos a SDS-PAGE (**Figura 16**). As bandas obtidas entre os 42 e 95 kDa no DNase pellet e DNase sobrenadante foram isoladas do gel e submetidas a análise em MS/MS. Nos resultados obtidos (**Tabela 6**), nota-se que mais uma vez não foi possível identificar Orc1/Cdc6, nem mesmo na banda de 50 kDa obtida do pellet. Mais que isto, esta análise não identificou proteínas que interagem com o DNA.

Para analisar proteínas em espectrometria de massa, as amostras devem ser tratadas para uma digestão tripsínica, este procedimento pode ser realizadas a partir de duas formas: i) bandas recortadas das amostras submetidos a SDS-PAGE, e ii) proteínas provenientes das amostras em solução, ou seja imediatamente depois de realizar o ensaio de extração de proteínas ligadas ao DNA.

Como anteriormente analisamos as proteínas provenientes das bandas recortadas das amostras submetidos a SDS-PAGE, então , nós decidimos analisar as frações de DNase (1 e

2) na sua totalidade, utilizando amostras em solução e analisando no QTOF. Nas análises da fração DNase 1 foram identificadas 37 proteínas e na amostra DNase 2 foram identificadas 30 proteínas. Para aumentar o número de proteínas detectadas, a alíquota DNase 1 passou em solução no LTQ (corrida de duas horas e fragmentação dos quatro íons mais intensos) e a sua análise mostrou a presença de 103 proteínas. A metodologia para passar a amostra de DNase 2 também foi alterada para duas horas (Ms/Ms dos 10 íons mais intensos) obtendo-se assim 60 proteínas. Destas, 66 % proteínas de metabolismo (entre as que mencionamos: glutamil carboxipeptidase, tirosina aminotransferase, glutamato dehidrogenase) e 17 % proteínas que interagem com o DNA (como as histona H4, histona H2A, proteínas ligadas a RNA). No entanto, infelizmente não foi detectada a proteína Orc1/Cdc6. Abordamos então outra estratégia que nos permita ter a proteína em maior quantidade e assim possa ser identificada nas frações.

Figura 16 - Frações celulares obtidas a partir do extrato diferencial.

(A) As frações obtidas a partir da centrifugação do extrato de DNase 2 (pellet e sobrenadante) foram submetidas a SDS-PAGE. O gel foi corado com *Comassie Blue*. As linhas pontilhadas representam as bandas selecionadas para a análise de espectrometria de massa.

Tabela 6 - Quantidade de proteínas identificadas por espectrometria de massa.

DNase (Pellet)	
95 kda	pyruvate phosphate dikinase, putative /hypothetical protein, conserved / mais 7 retrotransposon hot spot protein
80 kda	pyruvate phosphate dikinase, putative / mais 3 x dispersed gene family protein 1 (DGF-1, pseudogene), putative
72 kda	69 kDa paraflagellar rod protein, putative / paraxonemal rod protein PAR2, putative
60 kda	glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase, putative / retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative / mais 2 x hypothetical protein, conserved
52 kda	elongation factor 1-alpha (ef-1-alpha), putative /6-phospho-1-fructokinase, putative /alpha tubulin, putative / alpha tubulin, putative / beta tubulin (pseudogene), putative / hexokinase, putative / beta tubulin, putative / hypothetical protein, conserved
50 kda	hexokinase, putative
45 kda	glutamate dehydrogenase, putative / hypothetical protein, conserved
42 kda	glutamamyl carboxypeptidase, putative,metallo-peptidase, clan MH, family M18, putative / ATP synthase, alpha chain, mitochondrial precursor, putative / fructose-bisphosphate aldolase, glycosomal, putative / phosphatidylinositol kinase domain protein, putative / hypothetical protein, conserved

DNase (Sobrenadante)	
KDa	heat shock 70 kDa protein, putative
-52Kda	glutamamyl carboxypeptidase, putative,metallo-peptidase, clan MH, family M18, putative / glutamamyl carboxypeptidase, putative,metallo-peptidase, clan MH, family M18, putative / enolase;evidence=inferred from sequence orthology
-42 Kda	family M18, putative / prostaglandin F2alpha synthase

Acima, amostras obtidas a partir das bandas cortadas do gel proveniente do pellet da fração insolúvel (DNase 2) do extrato diferencial. Abaixo, proteínas identificadas das amostras do sobrenadante da fração de DNase 2 do extrato diferencial.

4.1.2 Super expressão da proteína *Orc1/Cdc6* em *Trypanosoma cruzi*

Como acreditamos que a pouca quantidade da proteína *Orc1/Cdc6* obtida na abordagem anterior tenha impossibilitado a detecção desta proteína por espectrometria de massa, decidimos gerar a super-expressão da *Orc1/Cdc6*. Sendo assim, foram transfectadas células de *Trypanosoma cruzi* com o plasmídeo que contém pTEX-TAP-tag-*Orc1/Cdc6* disponível no laboratório. O TAP tag é uma sequência constituída por duas subunidades de proteína A com afinidade por IgG, um sitio de clivagem para a TEV (*Tobacco Etch Virus*)

protease e um peptídeo de ligação à calmodulina (CMB – *calmodulin binding protein*). Esta etiqueta de purificação é fusionada à proteína de interesse (**Figura 17**).

Figura 17 – Representação ilustrativa do epitopo TAP tag

A figura mostra a estrutura do epitopo TAP tag fundida à proteína Orc1/Cdc6 em *T. cruzi* mostrando a possível ligação a outras proteínas.

Nós conseguimos gerar três transfectados: dois contendo a proteína Orc1/Cdc6, denominados Orc¹ e Orc² e um transfectado contendo somente o epitopo TAP tag que foi utilizado como controle. Para determinar se estes transfectantes expressam a proteína Orc1/Cdc6 fundida na etiqueta TAP tag, realizamos ensaios de *western blotting* utilizando um anticorpo que reconhece a sequência de CBP (29 KDa) e outro anticorpo que reconhece a proteína Orc1/Cdc6 (49 KDa). Após análise dos extratos protéicos por *western blotting*, observou-se que os dois anticorpos reconhecem uma banda com tamanho de 78 KDa, que corresponderia à proteína Orc1/Cdc6 ligada a TAP tag (**Figura 18**).

Figura 18 - Expressão de Orc1/cdc6 fundida ao epitopo TAP-tag.

Extratos protéicos das duas culturas de *Trypanosoma cruzi* obtidas após transfeção com a Orc1/Cdc6-TAP-tag (Orc1/Cdc6 amostra 1 e amostra 2) e a cultura transfectada somente com TAP-tag (controle) foram submetidos a SDS-PAGE, transferidos à membrana de nitrocelulose e incubados com anti-CBP (*calmodulin binding peptide*) ou com o anticorpo policlonal anti-Orc1/Cdc6. A proteína Orc1/Cdc6 fundida ao tag corresponde a 78 KDa.

4.1.2.1 Ciclo celular dos parasitas transfectados

Após evidenciar a super expressão da proteína Orc1/Cdc6 exógena em *T.cruzi* avaliamos o crescimento celular e as fases do ciclo celular do parasita para avaliar as possíveis modificações causadas pela super expressão da proteína Orc1/Cdc6. A **Figura 19A** mostra que não houve diferença no crescimento dos super expressores de Orc1/Cdc6, quando comparados com o controle. No entanto, análise do ciclo celular destas células por citometria de fluxo mostraram que o super expressor Orc1/Cdc6¹ apresenta uma parada transitória na fase G1/S, pois se observa um aumento de células em G1 e diminuição de células em S em relação ao controle (**Figura 19**).

Figura 19 - Curva de crescimento dos parasitas transfectados

(A) Curva de crescimento dos parasitas transfectados (TAP tag Orc1/Cdc6) e o controle (TAP tag), durante três dias de crescimento. (B) Os transfectantes foram corados com iodeto de propídeo e analisados por citometria de fluxo. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi determinada utilizando o programa *cylchred*[®].

4.1.2.2 Obtenção de extrato protéico e purificação protéica por TAP tag

Após confirmação que os parasitas estavam expressando a Orc1/Cdc6 fundida ao epítopo tag, procedeu-se à obtenção do extrato protéico ideal para iniciar a purificação da proteína. Testes prévios usados para a obtenção de extratos totais indicavam que a concentração de NP-40 no protocolo de extração de proteínas influenciava na determinação da quantidade de proteínas presentes nesses extratos. Assim, decidimos realizar extrações

onde foi modificada a concentração de NP-40: 0,01 %; 0,1 % e 1 % no volume final da solução de extração. As amostras obtidas foram analisadas por *western blotting* usando o anticorpo anti-Orc1/Cdc6 que reconhece a banda na altura de 78 KDa que representa a Orc1/Cdc6 ligada ao epitopo tag (Figura 20). Concluímos que a melhor obtenção de proteínas se deu na presença de 0,01 % NP-40. Nota-se que a banda obtida corresponde a Orc1/Cdc6 exógena. A proteína endógena (49 kDa) não foi visualizada neste experimento, talvez por estar em bem menor quantidade que a exógena.

Figura 20. Padronização do tampão para extrato protéico.

Os parasitas transfectados foram utilizados para preparação de extratos protéicos, utilizando-se diferentes concentrações de NP-40. Os extratos foram submetidos a SDS-PAGE, transferidos para nitrocelulose e incubados com anti-Orc1/Cdc6. A seta indica a banda de massa esperada para proteína Orc1/Cdc6 fusionada ao epitopo tag. *Linha 1, 2 e 3* (0,01 % de NP-40); *Linha 4, 5 e 6* (0,1 % de NP-40) e *Linha 7, 8 e 9* (1 % de NP-40). *Linha 1, 4 e 7* (amostra controle transfectada com epitopo tag), *linhas 2, 5 e 8* (Orc1/Cdc6 amostra 1) e *linhas 3, 6, e 9* (Orc1/Cdc6 amostra 2).

Após selecionar o protocolo de extração para o parasitas transfectados, iniciou-se a purificação de Orc1/Cdc6, partindo de 3×10^{10} parasitas, colocando o extrato protéico na primeira resina (IgG), onde a subunidade de proteína A da etiqueta deve grudar-se na resina de IgG. O extrato antes de ser submetido à coluna, o extrato contendo as proteínas que não se ligaram a coluna, bem como a resina de IgG foram analisados em *western blotting* utilizando-se anticorpo anti-Orc1/Cdc6 (**Figura 21**). Nota-se que tanto na amostra 1 quanto 2 a maior

parte de Orc1/Cdc6 exógena fica retida na coluna, como pode se ver pela sua ausência no extrato “flow through” bem como pela sua presença na resina.

Figura 21 - Amostra dos parasitas transfectados na etapa de purificação da TAP tag Orc1/Cdc6 em resina de IgG.

Amostras do extrato celular (pré-coluna), amostra não grudada (*Flow through*) e amostras retidas na resina de IgG (resina) foram analisados em *western blotting* usando anti-Orc1/Cdc6. As bandas indicadas pelas setas representam a altura de 78 KDa que corresponde à TAP tag Orc1/Cdc6. Controle: extrato de parasita transfectado somente com TAP tag.

A *Clivagem do sitio TEV*

Após a ligação da etiqueta à resina de IgG, nosso próximo objetivo era de separar o fragmento ligado à coluna de IgG, correspondente à proteína A. Então foi usada a enzima TEV protease para agir sobre o sitio de clivagem da etiqueta, isto é entre as subunidades CBP (*Calmodulin Binding Peptide*) e proteína A. Após a clivagem obtém-se Orc1/Cdc6 fundida somente ao domínio CBP. A amostra Orc1/Cdc6¹ retida na resina de IgG foi clivada com a TEV protease. O produto eluído da resina foi então analisado por *western blotting* com anti-Orc1/Cdc6 (**Figura 22**). De fato, Orc1/Cdc6 foi eluída da coluna após digestão com TEV.

Figura 22 - Orc1/Cdc6 é eluída da coluna de IgG após digestão com TEV protease.

Amostra Orc1/Cdc6¹ foi eluída da resina de IgG por digestão com TEV. O eluato da coluna foi corresponde à proteína Orc1/Cdc6 ligada a CBP. Controle representa o extrato do parasita transfectado com TAP tag.analisado por *western blotting* utilizando anticorpo anti-Orc1/Cdc6. A banda na altura de 58 KDa

B Ligação na coluna de calmodulina

Uma vez verificada a presença da proteína Orc1/Cdc6 no eluato após clivagem do sitio da TEV protease, colocamos a amostra na resina de calmodulina. Este passo faz-se na presença de cálcio, com a finalidade de eliminar os contaminantes que ainda ficaram nos eluatos e assim purificar a proteína Orc1/Cdc6 juntamente com as proteínas a ela associadas. A resina de calmodulina foi analisada por *western blotting* usando o anticorpo policlonal anti-Orc1/Cdc6 que reconhece a banda na altura de 58 KDa correspondente a Orc1/Cdc6-CBP, demonstrando que Orc1/Cdc6-CBP conseguiu grudar à resina de calmodulina (**Figura 23**).

Figura 23. Extrato de parasita na segunda etapa de purificação da TAP tag Orc1/Cdc6 em coluna de calmodulina.

Amostras do extrato de parasita na resina de calmodulina (CBP-Orc1/Cdc6). As bandas representam a altura de 58 kDa que corresponde a Orc1/Cdc6-CBP. Controle: extrato de parasita transfectado somente com TAP tag.

4.1.2.3 Caracterização da proteína Orc1/Cdc6 no parasita transfectado

Nesta etapa, a proteína Orc1/Cdc6 foi desligada da CBP que esta grudada à resina de calmodulina, utilizando para isso um agente quelante de cálcio EGTA (*ethylene glycol tetraacetic acid*). Após obtenção do eluato, essa amostra foi avaliada no ensaio de *western blotting* usando anti-Orc1/Cdc6 para verificar a sua presença, mas infelizmente a Orc1/Cdc6 não foi eluída da resina (dado não mostrado). De qualquer maneira, para se obter a proteína Orc1/Cdc6 e os possíveis ligantes foi usada a amostra da eluição com a TEV protease obtida na etapa anterior, para passar no aparelho de espectrometria de massa. Nesta etapa também não foi detectada a proteína Orc1/Cdc6.

A análise com as amostras purificadas em coluna de IgG nos permitiu identificar através de espectrometria de massa a proteína Orc1/Cdc6 de *Trypanosoma cruzi* com uma identidade de 0.9976 (**Figura 24**). Também foi possível detectar outro peptídeo (**Figura 25**), com identidade de 0.9868. Quando comparado ao banco de dados de tripanosoma, este peptídeo encontra-se situado numa sequência de *Trypanosoma cruzi* (Tc00.1047053503439.61) que está anotada como um pseudogene de retrotransposon “*hot spot protein*”. Esta proteína de *T. cruzi*, no entanto, apresenta similaridade (27,5%) com a proteína Orc2 de *Drosophila melanogaster* (**Figura 25**).

Figura 24 - Proteína Orc1/Cdc6 identificada por espectrometria de massa.

Sequência da Orc1/Cdc6
<p> <u>MNSRVILVFG ENCMKRRRA DETKKIIAALR AGVAALSVS STAAAKELTC</u> <u>RNAHLAIVE FLNDSVHPV MQIFGMPGT GKTASVNHA LTLLAQSAAP</u> <u>GRKPTAVFL NGYVIQKNS DIYWTLNSH LSKARLGHT ENCLPDQCA</u> <u>ALIEKRFRQ GWGGASTP LCVIVIDEVD KVLKRHNKA FFRIVDWLSF</u> <u>PFAFCKLVTI SNSMELAAD AKTRSRLDIT KRLVFEPYS FSELKEILLR</u> <u>RVGKIKPTLF AEKAINYLC NQTASHYG DVRRLLQSAS SAVCGLMM</u> <u>KLEEGYR VPEAQDVLL TVKDVHAVV RQIFHDFRV EFQITIRLPIL FISVAVVAH</u> <u>ETNKLFRSN PGDCRLSL DGLFLSTKR AQQIYSASL GEPHTVDLT</u> <u>YGAYLDIVE MLREVALID VSGEERIP VKTTQNLLE ATEKAYVS MLQPFPTVL</u> <u>DACQLHDV FEGGINPLF KT SHKRKR WKKNFIAVA AANRFKKIS</u> <u>SSGALDYDI PTTASENLY FQGELVDN KFNKEQQN AFYEILHLP NLNEEQRN</u> <u>AFIQSLKDD PSQSANLLA EAKKLNDQA APKVDNKNE KEQNAFY</u> <u>EILHLPNLNE EQRNAFIQS LKDDPSQSA NLLAEAK KLNGAQAPK</u> <u>VDANSAGK STVDNKFNK EQQNAFY ILHLPLNEEQ RNAFIQSLK</u> <u>DDPSQSAN LLAEAKKLN DAQAPKVD NKNEKEQQ NAFYEILHLP NLNEEQRN</u> <u>AFIQSLKDD PSQSANLLA EAKKLNGA QAPKVDAN SAGKST</u> </p>

As amostras em solução proveniente do extrato protéico dos parasitas transfectados com TAP, tag.Orc1/Cdc6, purificadas em coluna de IgG foram analisados no espectrômetro de massa. A região sublinhada indica a sequência identificada da amostra que tem homologia com a proteína Orc1/Cdc6 de *Trypanosoma*. A região subsequente da Orc1/Cdc6 (sublinhada) corresponde à sequência do epítopo TAP-tag. Em amarelo é mostrada as regiões identificadas no espectrômetro de massa.

Figura 25 - Sequencia identificada por espectrometria de massa.

Sequência de Tc00.1047053503439.61
<p> MVWRCWGWLVHVVFLRRRWASTVLPTGVAVRLHGAPTTTPCECHAQRHWDGCTKQPRLSFG ASGTCWPRLGGASGMLHRTGVVMAPRRGSCDGSDAARHVARSKVWPQWTMSSTNMRLSDFLW NYVGGRAAVDERLQCDDGGVCSGAG*LRTPAAS*RSS*LDRLTGVQTSSRRVCVLSQ QWKEYEGNDVTPIARGKLNALFQAQNSMKMSASNKLEGHYESVYNARWHHVVEVPGGE GTGMDVREGKPPQSWTYNAVGRTEKMTVWRNPVHHVPG*WCSPPRRRDGRTRGIRYRIFL RTFL*TVRWGERGRSSGMISPNGSALTVGPTLSPSSIS*LGRPGSGNRWLPARTSSTSCC TAVSRNSKWLYTLRKKHFCLTRPSRR*QNTILMKCRGVLSRVCGSMG*KGMSFTMC**R VVIRRRFFVPSEWGMIVLTPNENNFEGWRRHKTAVPLIINCPDRIDVKAMCFWRKHMQPT GEQVREQAKYWETVEERMDEVGPIPRCVFNEIEYKIQLSAIEKAVKLIEPSNATDYMVG RSKIWAIEDVSHTIVRFVRVREEPGIEVGCNAPVSRSAMATITQHLTHMTTPVDVFNLLL RNFSCFLWVFEYAGTATFMNPHAVVVIQKRLTELQP*GRITSQFSVLRRNPRGHPTRSE TLKKTCTVATLTGLIWSAGYCTYRLSETFRWWMPFSSWSRRGKRWLGCG*LRRVRTTPEPA LCGSSLSAWRHILTIGRNLPATCRGRLFMHSTQTAQ**LTGRNVMIRRM*QKLRIK*RR AGGGKGTVPVSSD </p>

A sequência protéica acima mostrada contém a região peptídica identificada por espectrometria de massa a partir das amostras em solução proveniente do extrato protéico dos parasitas transfectados purificadas em coluna de IgG. A sequência identificada está presente no genoma de *T. cruzi*, e é encontrado na base de dados como Tc00.1047053503439.61. Em amarelo mostra-se a região identificada no espectrômetro de massa.

4.2 Controle do balanço redox $NAD^+/NADH$ na interação da proteína GAPDH com o DNA telomérico de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*

4.2.1 A proteína GAPDH interage com o DNA em tripanosomas

Tendo como base citações bibliográficas nas quais a proteína GAPDH apresenta funções relacionadas a eventos biológicos que ocorrem no núcleo em mamíferos (TRISTAN et al., 2011) e que a ligação de GAPDH ao telômero cumpre a função de proteção frente ao encurtamento dos cromossomos causados por fatores físicos (DEMARSE et al., 2009), surgiu-se o interesse de saber se a GAPDH encontrava-se associada ao DNA em tripanosomas.

Com o intuito de verificar se a proteína GAPDH se encontra associada ao DNA de *T. cruzi* (forma epimastigota) e ao DNA de *T. brucei* (forma procíclica), realizamos ensaios de extrato diferencial. Tanto as frações solúveis e as frações insolúveis (contendo as proteínas ligadas ao DNA (DNase)), foram utilizadas em ensaios de *western blotting*, utilizando anti-GAPDH, anti-hsp70 (como controle de proteínas solúveis) e anti-histona (como controle de proteínas ligadas ao DNA). Na **Figura 26**, observamos que a proteína GAPDH se encontra na fração solúvel (sol 1 e 2) em ambos os parasitas. Igualmente a GAPDH foi encontrada nas frações das proteínas ligadas ao DNA (DNase 1 e 2) no extrato da forma epimastigota de *T. cruzi* e na forma procíclica de *T. brucei*.

Figura 26 - Interação da proteína GAPDH com o DNA de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*.

As frações solúvel (sol 1 e 2) e insolúvel que se ligam ao DNA (DNase 1 e 2) dos extratos diferenciados de *T. cruzi* e *T. brucei* foram submetidos a SDS PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose e incubados com anticorpos anti-GAPDH, anti-histona H4 e anti-hsp70. As bandas correspondem à proteína GAPDH (painel superior) ou a proteína hsp70 (painel médio), controle da fração solúvel, ou a proteína histona H4 (painel inferior), controle da fração de proteínas ligadas ao DNA.

4.2.2 A GAPDH está presente associada ao DNA durante todo o ciclo celular de *T. cruzi*

Após verificar a presença da proteína GAPDH na fração do extrato que corresponde a proteínas ligantes de DNA (obtidas após digestão com DNase), fomos avaliar a expressão de GAPDH durante o ciclo celular a fim de verificar se esta interação é mais evidente durante a síntese de DNA, como ocorre para outras proteínas ligantes de DNA. Para isso, culturas de epimastigotas de *T. cruzi* foram sincronizadas com hidroxíureia por 24 horas de incubação, seguidamente as células foram avaliadas após lavagem. As células foram avaliadas imediatamente após lavagem e após 6hrs e 14hrs, que correspondem às diferentes fases do ciclo celular G1/S, S e G2, respectivamente (ELIAS et al., 2002). Logo depois, os extratos celulares de cada fase foram submetidos a ensaios de *western blotting* utilizando anticorpo anti-GAPDH. A **Figura 27** mostra que a proteína GAPDH está presente associada ao DNA em concentrações semelhantes em todas as fases G1/S, S e G2 do ciclo celular em *T. cruzi*, em ambas das frações (fração solúvel e fração de interação com DNA).

Figura 27. Expressão de GAPDH durante o ciclo celular de *T. cruzi*.

Epimastigotas foram tratados com hidroxíureia por 22 horas, após tratamento foi feito o extrato diferencial de proteínas nas células às 0 (G1/S), 6 (S) e 14 hrs (G2). Esses extratos foram submetidos a SDS-PAGE, logo depois transferidos para membrana de nitrocelulose e incubados com anti-GAPDH.

4.2.3 A proteína GAPDH da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* não interage com o DNA

Ao mostrar a presença da GAPDH em *Trypanosoma cruzi* na forma epimastigota (forma não infectiva e replicativa), decidimos realizar experimentos para verificar se a GAPDH se encontra na forma tripomastigota (forma infectiva não replicativa). Para isso, realizamos um extrato diferencial, onde se obteve amostras de frações solúveis e insolúveis. Ao submeter essas frações a ensaios de *western blotting*, verificou-se a presença de GAPDH usando anticorpo anti-GAPDH, também foram usados controles para a fração solúvel (anti-

Hsp70) e fração ligada ao DNA (anti-histona H4). A **Figura 28** mostra a presença da proteína GAPDH na fração solúvel, mas na fração ligada ao DNA não foi observada a presença da banda correspondente à proteína GAPDH na forma tripomastigota de *T. cruzi*.

Figura 28 - Interação da proteína GAPDH com o DNA de *Trypanosoma Cruzi* forma tripomastigota.

As frações solúvel (sol 1 e 2) e insolúvel (DNase 1 e 2) dos extratos diferenciados de *T. cruzi* na forma tripomastigota foram submetidos a SDS PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose e incubados com anticorpos anti-GAPDH, anti-histona H4 e anti-hsp70. As bandas correspondem à proteína GAPDH (painel superior) ou a proteína hsp70 (painel médio), controle da fração solúvel, ou a proteína histona H4 (painel inferior), controle da fração de proteínas ligadas ao DNA.

4.2.4 *rTcGAPDH* interage com a simples fita de DNA telomérico *in vitro*

Uma vez verificada a presença da GAPDH nas frações que correspondem às proteínas que interagem ao DNA, propusemos-nos investigar se a GAPDH estaria se ligando à fita de DNA telomérico *in vitro*. Para isso, foram realizados experimentos de *Band Shift* (EMSA), nos quais utilizamos a proteína recombinante purificada de GAPDH de *T. cruzi* (rTcGAPDH) e os oligonucleotídeos de telômero de simples fita e de dupla fita (**Figura 29**).

Iniciamos este grupo de experimentos escolhendo a concentração ideal da proteína GAPDH nos ensaios de EMSA, para isso analisamos a associação de oligonucleotídeos de simples fita ou dupla fita com concentrações crescentes da proteína recombinante GAPDH de *T. cruzi* (**Figura 30**). Encontrando que a concentração ideal para realizar nossos ensaios é de 1 µg da proteína GAPDH. Além disso, a proporção do gel de acrilamida: bis acrilamida também foi alterada (37,5:1), o que nos deu um melhor resultado.

Figura 29 – proteína rTcGAPDH e oligonucleotídeos utilizados no ensaio do EMSA

(A) proteína recombinante GAPDH purificada (37 KDa), analisada em SDS-PAGE corado com *Comassie Blue*. (B) oligonucleotídeos simples fita e dupla fita marcados com digoxigenina, nas concentrações decrescentes de 0,155 pmol (1), 0,0155 pmol (1:10), 0,00155 pmol (1:100) e 0,000155 pmol (1:1000) no ensaio de EMSA.

Figura 30. Interação da proteína GAPDH com o oligonucleotídeos do telômero.

Oligonucleotídeo dupla fita (A) e simples fita (B) de telômero foram incubados com a proteína recombinante GAPDH de *T. cruzi* nas concentrações decrescentes 1 µg, 100 ng, 10 ng e 1 ng no ensaio de EMSA. A banda superior em (B) indica a interação proteína-DNA que se observa pela presença da proteína GAPDH.

Após ter padronizado alguns parâmetros no ensaio do EMSA e para evitar que a dupla fita apresentasse extremidades livres que poderiam ocasionar resultados não confiáveis, colocamos nos extremos dos oligonucleotídeos sequências complementares, pareáveis entre si. Seguindo esses cuidados nós realizamos ensaios de EMSA utilizando os dois tipos de oligonucleotídeos (simples fita e dupla fita de DNA). A **Figura 31** mostra que a formação do complexo proteína-DNA ocorre quando a GAPDH está em contato com o oligonucleotídeo de

simples fita, evidenciado com a presença da banda superior, mas isto não ocorre quando a proteína foi incubada com o oligonucleotídeo de dupla fita.

Figura 31 - Interação da proteína GAPDH com os oligonucleotídeos do telômero.

Oligonucleotídeo simples fita (A) e dupla fita (B) de telômero foram incubados com a proteína recombinante GAPDH de *T. cruzi* na concentração de 1 µg no ensaio de EMSA. A seta indica a banda que se observa na presença do complexo GAPDH-DNA.

Figura 32. Interação da proteína GAPDH com o oligonucleotídeos simples fita do telômero.

(A) Oligonucleotídeo simples fita “sense” (GAA TTC GGT TAG GGT TAG GGT TAG GAA TTC) e (B) Oligonucleotídeo simples fita “anti-sense” (CTT AAG CCA ATC CCA ATC CCA ATC CTT AAG) de telômero foram incubados com a proteína recombinante GAPDH de *T. cruzi* na concentração de 1 µg e incubados com anti-rTcGAPDH, respectivamente, no ensaio de EMSA.

Após ter observado que a GAPDH tem afinidade por oligonucleotídeos de simples fita, estávamos interessados em saber se essa ligação era característica de um dos oligonucleotídeos “sense” ou “anti-sense”. Para comprovar este fato, realizamos ensaios de EMSA com estes oligonucleotídeos. Nossos dados mostram que a GAPDH interage independentemente com as duas simples fitas testadas no experimento, podemos também

observar a formação de “*super shift*”, que acontece quando as amostras são incubadas com anticorpo anti-GAPDH, confirmando dessa forma, que o complexo formado com o oligonucleotídeo é a proteína rTcGAPDH (**Figura 32**).

Confirmada que a interação rTcGAPDH-DNA é característica em oligonucleotídeos de simples fitas, avaliamos se essa interação tinha preferência pela quantidade de repetições da sequência telomérica. Para isso, foram realizados ensaios de EMSA usando várias quantidades de ‘repeats’ (GGT TAG), ou seja, amostras contendo 6 (1 repeat), 18 (3 repeats) e 36 nucleotídeos (6 repeats). A **Figura 33** mostra a formação do complexo proteína-DNA nos três tamanhos de oligonucleotídeos usados, sugerindo assim, que para que ocorra a interação de GAPDH com DNA precisa-se somente de um ‘repeat’ de telômero.

Figura 33 - Interação da proteína GAPDH com diferentes tamanhos de oligonucleotídeos simples fita do telômero.

DNA simples fita 6 nucleotídeos	+	-	-
DNA simples fita 18 nucleotídeos	-	+	-
DNA simples fita 36 nucleotídeos	-	-	+
rTcGAPDH	+	+	+

Oligonucleotídeo simples fita de 6 nucleotídeos (GGT TAG), 18 nucleotídeos (GGT TAG GGT TAG GGT TAG) e 36 nucleotídeos (GGT TAG GGT TAG GGT TAG GGT TAG GGT TAG GGT TAG) de telômero foram incubados com a proteína recombinante GAPDH de *T. cruzi* na concentração de 1 µg no ensaio de EMSA.

Com a finalidade de estabelecer que a interação entre a proteína GAPDH e o DNA telomérico é específica, realizamos ensaio de competição utilizando oligonucleotídeos “frios” (não marcados). Nos ensaios de EMSA, utilizamos diferentes concentrações de oligos frios de simples fita (1, 10, 100 e 1000 vezes mais concentrado), e concentrações constantes de oligonucleotídeos marcados (“*sense*” e “*anti-sense*”) e a proteína rTcGAPDH. Na **Figura 34A-esquerda** é mostrada a interação da proteína com o oligonucleotídeo *sense* marcado, a competição pela proteína é observada quando foram aumentadas as quantidades de

oligonucleotídeo sense frio, na quantificação este evento foi melhor observado (**Figura 34A-direita**), onde houve uma tendência de queda devido ao aumento de oligo frio. A mesma competição foi observada para a fita “*anti-sense*” marcada (**Figura 34B-esquerda**) com o oligo antisense (**Figura 34B-direita**).

Figura 34 - Competição na interação da proteína GAPDH-DNA telomérico por oligonucleotídeos contendo sequência telomérica não marcada (frio).

(A) Oligonucleotídeo simples fita “*sense*” (GAA TTC GGT TAG GGT TAG GGT TAG GAA TTC) de telômero foi incubado com 1 µg da proteína GAPDH, foi adicionado o mesmo oligonucleotídeo frio como competidor da interação em concentrações de 1, 10, 100 e 1000 vezes, o gráfico da direita mostra as bandas de interação quantificadas, obtidas na competição com o oligonucleotídeo frio. (B) Oligonucleotídeo simples fita “*anti-sense*” (CTT AAG CCA ATC CCA ATC CCA ATC CTT AAG) de telômero foram tratados como em (A) no ensaio de EMSA, (direita). As bandas correspondentes à interação proteína-DNA no ensaio de competição foram quantificadas. As médias e desvios padrão são triplicatas de experimentos independentes.

Uma vez mostrada a competição com oligonucleotídeos específicos frios, repetimos os ensaios de EMSA utilizando uma sequência aleatória inespecífica como competidor. Neste ensaio foram usadas concentrações crescentes do oligonucleotídeo competidor (1, 10, 100 1000 vezes mais concentrado) e concentrações constantes de oligonucleotídeos marcados de telômero e da proteína rTcGAPDH. A **Figura 35A** e **35B** mostram que na presença de

competidor inespecífico, o complexo formado que corresponde à interação proteína-DNA não sofre alteração, sugerindo assim, a especificidade da proteína GAPDH com o DNA telomérico.

Figura 35 - Competição na interação da proteína GAPDH-DNA telomérico por oligonucleotídeos contendo sequência inespecífica (MCM subunidade 4) não marcada (frio).

(A) Oligonucleotídeo simples fita “sense” (GAA TTC GGT TAG GGT TAG GGT TAG GAA TTC) de telômero e oligonucleotídeo simples fita “anti-sense” (B) foram incubados com a proteína recombinante GAPDH em concentração constante de 1 μ g e foram usados como competidores inespecíficos da interação o oligonucleotídeo (GCGGCCGCATGGACAGAGAT TCACTTGTGG) frio, onde se teve concentrações ascendente 1, 10, 100 e 1000 vezes mais concentrado em relação ao oligo telomérico marcado(direita) grafico mostrando as bandas de interação quantificadas, obtidas na competição com o oligonucleotídeo frio. Os gráficos mostram as quantificações realizadas das bandas obtidas no ensaio de competição por oligonucleotídeo inespecífico. As médias e desvios padrão são triplicatas de experimentos independentes.

4.2.5 O NAD^+ inibe a interação da rTcGAPDH com a simples fita telomérica

Como já foi mostrado na literatura que a GAPDH liga ao DNA telomérico via domínio NAD^+ (DEMARSE et al 2009) e como a sequência telomérica em mamíferos (MOYSIS et al., 1988) é igual que em tripanosomas, nos decimos ver se a GAPDH de tripanosoma liga se ao DNA telomérico via domínio NAD^+ . A **Figura 36A-acima** mostra esta competição, onde a banda superior some quando é aumentada a concentração de NAD^+ , indicando uma inibição

na interação proteína-DNA. Ao quantificar as bandas obtidas nesta competição (**Figura 36A-abaixo**) foi evidenciada a diferença dos números obtidos, onde a distribuição numérica mostrou um decréscimo regular em relação ao aumento da concentração de NAD^+ . Na presença de NADH não houve inibição da interação (**Figura 36B-acima**). Apesar do aumento de concentração de NADH, as bandas que correspondem à interação não sofreram alteração, isto foi confirmado através das quantificações das bandas provenientes dos ensaios de EMSA. Observeu-se no ensaio de EMSA (**Figura 36C**) que a competição na interação da proteína/DNA não foi alterada na presença de lisina. Esses dados mostram que o DNA telomérico liga-se à rTcGAPDH via domínio NAD^+ .

Figura 36 - Competição na interação da proteína GAPDH-DNA telomérico por NAD^+ e NADH.

(A) Concentração fixa de rTcGAPDH (1 μg) foram incubadas com concentrações crescentes (50, 75 e 100 μM) de NAD^+ . (Direita) o gráfico mostra as quantificações das bandas obtidas no ensaio de EMSA. (B) Concentração fixa de rTcGAPDH (1 μg) foram incubadas com concentrações crescentes (50, 75 e 100 μM) de NADH (Direita) quantificação das bandas da interação proteína-DNA após ensaio de EMSA. (C) Ensaio de EMSA usando lisina como controle da competição com NAD^+ , na presença de simples fita de DNA telomérico. As médias e desvios padrão são triplicatas de experimentos independentes.

4.2.6 *rTcGAPDH interage com o DNA telomérico in vivo*

Para realizar os ensaios de ChIP foi necessário avaliar se o anticorpo anti-rTcGAPDH era capaz de imunoprecipitar a proteína GAPDH nos extratos celulares de tripanosomas. Para tanto, realizamos ensaio de imunoprecipitação de extratos de epimastigota de *Trypanosoma cruzi* usando o anticorpo rTcGAPDH. Na **Figura 37** observa-se que foi possível imunoprecipitar a proteína GAPDH.

Figura 37 - Imunoprecipitação da proteína GAPDH no extrato celular de *Trypanosoma cruzi*.

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram utilizadas em ensaio de imunoprecipitação utilizando anti-rTcGAPDH. O produto da imunoprecipitação foi submetido a SDS PAGE e corado com ponceau.

Pelos dados *in vitro* mostrados anteriormente, comprovamos a capacidade do rTcGAPDH de associar-se ao DNA em tripanosomas, especificamente ao DNA telomérico. No entanto, para mostrar se a interação entre proteína-DNA telomérico era possível *in vivo*, realizamos o ensaio de imunoprecipitação de cromatina utilizando anti-GAPDH em células de epimastigotes de *T. cruzi* e prociclicas de *T. brucei*. O produto desta imunoprecipitação foi hibridizado com sonda de DNA telomérico e sonda inespecífica, como controle. A **Figura 38** mostra a hibridização do produto de ChIP com a sonda de telômero, mas não com a sonda de inespecífica.

Figura 38 - Ensaio de ChIP com anti-rTcGAPDH em *Trypanosomas*.

Formas epimastigotas de *T. cruzi* e formas procíclicas de *T. brucei* foram utilizadas em ensaio de imunoprecipitação de cromatina utilizando anti-rTcGAPDH ou soro normal, como controle. O DNA obtido foi imobilizado em membrana de nylon e hibridizado com sondas de telômero ou com uma sequência inespecífica.

4.2.7 O NAD^+ inibe a interação da GAPDH com o DNA telomérico *in vivo* nos tripanosomas

Realizamos o ensaio de imunoprecipitação de cromatina com os extratos de culturas de *T. cruzi* e *T. brucei* tratadas previamente com 500 μM de NAD^+ ou NADH, usando o anticorpo anti-GAPDH. Os produtos da imunoprecipitação foram utilizados para o ensaio de hibridização com sonda de DNA telomérico. Na **Figura 39A** e **39B** se mostra a ligação de GAPDH com a sonda de telômero na presença de NADH, mas não foi observada essa ligação com a amostra tratada com NAD^+ , sugerindo uma inibição da interação proteína/DNA *in vivo* em ambos os tripanosomas na presença de NAD^+ . Foram também realizadas as quantificações de NAD^+ e NADH para os dois tripanosomas, onde foram observadas nessas células que a quantidade intracelular destes cofatores foram influenciadas pela presença de NAD^+ e NADH exógenos, tanto para *T. cruzi* como para *T. brucei* (**Figura 39C** e **39D**).

Figura 39 - Ensaio de ChIP com anti-rTcGAPDH em cultura de *Trypanosoma*, tratadas com NAD^+ ou NADH.

(A-B) Culturas de formas epimastigotas de *T. cruzi* e de formas procíclicas de *T. brucei* foram incubadas por 10 minutos na concentração de 500 μM de NAD^+ ou NADH, respectivamente. Logo após, foram realizados ensaios de imunoprecipitação de cromatina nas células de *T. cruzi* e *T. brucei* usando anti-rTcGAPDH e o DNA obtido foi imobilizado em membrana de nylon e hibridizadas com sondas de telômero. Os controles correspondem às culturas sem a adição de NAD^+ ou NADH. (C-D) Os gráficos mostram as quantificações das culturas de *T. cruzi* e *T. brucei* de NAD^+ e NADH intracelular após 10 minutos incubação de NAD^+ e NADH na concentração de 500 μM . As análises das quantificações foram realizadas usando o “ NAD^+ /NADH quantification kit” (BioVision®), seguindo as indicações do fabricante. As médias e desvios padrão de cinco experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando o programa *GraphPad Prism version 5.01*, análises de variância 2way ANOVA teste *Bonferroni*. e está apresentada em * para $p < 0,001$.

4.2.8 A proteína GAPDH não interage com o DNA telomérico do tripomastigota de *T. cruzi* in vivo

Sabe-se que as formas epimastigota e amastigotas (formas replicativas) apresentam alta taxa de fosforilação oxidativa (ATWOOD et al., 2005) que origina um elevado consumo de NAD^+ , portanto isto origina altas quantidades de NADH. Já nas formas tripomastigotas e metacíclicas (formas não replicativas), não ocorrem fosforilação oxidativa, então provavelmente não tem consumo de NAD^+ e consequentemente existem elevadas quantidades deste cofactor nesses tipos celulares. Após ter observado a ausência da proteína GAPDH nas frações ligadas ao DNA em *T. cruzi* na forma tripomastigota, nós realizamos quantificações de NAD^+ e NADH nas duas formas de vida epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi* (Figura 40A). Os valores obtidos mostraram que o NAD^+ intracelular da forma tripomastigota está elevada, sugerindo se que o aumento de NAD^+ esteja inibindo a formação da interação

GAPDH-DNA neste tipo celular. Confirmamos assim, através de ensaio de ChIP que GAPDH não interage com telômero em tripomastigotas (**Figura 40**).

Figura 40 - Interação proteína-DNA nas formas epimastigota e tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*.

(A) Cultura de *T. cruzi* nas formas Epimastigota e Tripomastigota na concentração de $2,4 \times 10^6$ células/mL foram quantificadas as concentrações de NAD⁺ e NADH intracelular. (B) As culturas das formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi* foram usadas para o ensaio de imunoprecipitação de cromatina usando anti-rTcGAPDH, o DNA obtido foi normalizado e imobilizado em membrana de nylon e hibridizadas com sondas de telômero. As médias e desvios padrão são triplicatas de experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando o programa *GraphPad Prism version 5.01*, análises de variância 2way ANOVA teste *Bonferroni*. e está apresentada em * para $p < 0,001$.

Visto que não foi observada a interação da GAPDH com o DNA telomérico na forma tripomastigota de *T. cruzi*, propusemos-nos a avaliar se o balanço redox da célula influencia na interação proteína-DNA dos tripomastigotas. Para tanto, as formas tripomastigotas foram incubadas com NAD⁺ ou NADH e submetidos a ChIP para análise da interação GAPD-telômero. Na **Figura 41A**, observamos que na cultura que foi adicionada NADH apresentou-se interação entre a proteína GAPDH e o DNA telomérico e não houve interação no ensaio usando sonda inespecífica (**Figura 41B**), sugerindo que a interação entre a proteína GAPDH e o DNA telomérico estaria sendo regulado pelo balanço redox NAD⁺/NADH da célula.

Figura 41 - Ensaio de ChIP com anti-rTcGAPDH em tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* na presença de NAD^+ e NADH.

Foram realizados ensaios de imunoprecipitação de cromatina nas células de tripomastigota de *T. cruzi*, incubadas com NAD^+ ou NADH, usando anti-rTcGAPDH e o DNA obtido foi imobilizado em membrana de nylon e hibridizado com (A) sonda inespecífica e (B) com sonda de telômero.

4.2.9 Análise estrutural da interação da GAPDH e o DNA telomérico

Como foi mencionado ao longo deste trabalho, a interação entre a proteína GAPDH e o DNA telomérico em tripanosomas acontece devido à interação do DNA telomérico ao sítio de ligação de NAD^+ . Para confirmar este dado, realizamos uma análise estrutural desta ligação. Para tanto, foi analisada a estrutura da proteína GAPDH de *T. cruzi*.

Utilizando experimentos de acoplamento computacional usando a estrutura 3DMT e a estrutura de DNA repetitivo correspondente a uma molécula de 11 nucleotídeos de simples fita telomérica foi possível localizar o ligante perto do sítio de ligação de NAD^+ . Quando foram realizados os cálculos de potencial eletrostático do modelo foram observadas duas regiões com carga positiva que pode acoplar uma molécula de DNA telomérico em cada lado da estrutura (**Figura 42**). Considerando a estequiometria, nossos resultados sugerem que dois oligonucleotídeos podem se ligar por cada tetrâmero. A região de sítio ativo inclui dois locais de ligação para NAD^+ , os quais envolvem ao nucleotídeo na posição diagonal, o que corresponde a sítios de ligação intercalados por cada motif que reconhece a TTAGGG. Ao realizar uma comparação das proteínas GAPDH de *T. cruzi* e humano (código PDB: 1U8F) observou-se que apesar dos sítios de ligação para NAD^+ não serem idênticos, eles mantinham características semelhantes às do sítio ativo de oligonucleotídeos, onde a distância entre cada sítio ativo era de 30 Å.

Finalmente, o modelo aqui apresentado propõe que a proteína GAPDH de *Trypanosoma cruzi* pode ligar a conformação de DNA telomérico de simples fita. Mostrado neste modelo que o DNA telomérico se liga à proteína entre dois sítios ligantes para NAD^+ ,

concordando assim com nossos resultados onde mostramos que existe uma competição entre o DNA telomérico e o NAD^+ pela proteína. O modelo mostra também que GAPDH não é capaz de associar-se a dupla fita de DNA.

Figura 42 - Acoplamento computacional da proteína GAPDH e a simples fita de DNA telomérico em *T. cruzi*.

(A) Estrutura cristalográfica da GAPDH de *T. cruzi* mostrando as quatro subunidades da estrutura tetramérica (azul, amarelo, vermelho e verde) e é mostrada onde cada subunidade se liga ao NAD^+ (círculo negro). (B) Estrutura mostrada em (A) com um giro de 90° , mostrando um sítio de ligação ao NAD^+ disposta diagonalmente na proteína. (C) Conformação da superfície isoelétrica da proteína GAPDH de *T. cruzi* após acoplamento do DNA. Aqui se mostra as regiões carregadas, em vermelho negativamente, em azul positivamente e em branco não possui carga elétrica. Dois sítios ativos estão flanqueando o sítio ligante, isto pode explicar a interferência observada na afinidade de NAD^+ na presença de DNA telomérico. As setas amarelas mostram a localização. (D) A mesma representação que em (C), mas com rotação de 90° . O retângulo amarelo representa uma superfície carregada positivamente o que pode indicar uma molécula de DNA simples fita telomérica juntamente com a proteína.

5.1 Busca de possíveis proteínas associadas a Orc1/Cdc6

Os resultados provenientes da análise de espectrometria de massa identificaram uma proteína possivelmente associada a Orc1/Cdc6. Esta proteína seria codificada por uma sequência (Tc00.1047053503439.61) anotada como um pseudogene retrotransposon “*hot spot protein*”. No entanto, apresenta homologia com a Orc2 de *D. melanogaster*.

Em tripanosomas ainda não foi bem estabelecido quantos são os componentes necessários para formar a maquinaria de pré-replicação. Existem duas vertentes. A literatura mostrou que os tripanosomas apresentam um único dímero Orc1/Cdc6 (Godoy et al., 2009) que reconhece a origem de replicação, semelhante à proteína Orc1/Cdc6 de arquea. Assim, a primeira vertente discute a possibilidade de tripanosomas apresentarem uma única proteína substituindo o complexo ORC e desempenhando o papel de reconhecer as origens de replicação. Esta hipótese já foi discutida por nosso grupo (CALDERANO et al., 2011).

A segunda hipótese seria que o complexo ORC de tripanosomas também seria composto por 6 subunidades. Estas subunidades seriam divergentes das subunidades de ORC dos demais eucariontes e por isto ainda não identificadas por análises *in silico*. Corroborando com esta segunda possibilidade, Dang e Li (2011) identificaram uma proteína denominada de Orc1b, que interage com a proteína Orc1/Cdc6 em tripanosomas. Recentemente, Tiengwe et al., (2012) mostraram uma proteína similar a Orc4 de *Drosophila*, que interage com a Orc1/Cdc6. Ainda não está descrito, no entanto, o papel destas proteínas no processo de replicação. Os dados aqui mostrados, apesar de preliminar, é relevante, porque nos brinda a possibilidade de estar frente a um novo componente do complexo de pré-replicação em tripanosomas.

As informações contidas nos resultados aqui mostrados devem ser mais bem explorados. A sequência por nós identificada apresenta um stop códon. Novos experimentos devem assim investigar a expressão e localização sub-celular desta proteína, bem como seu envolvimento no processo de replicação.

5.2 *Análise de GAPDH como proteína ligante de DNA telomérico e controle desta interação*

Já está estabelecido que GAPDH, inicialmente descrita como uma clássica enzima do metabolismo, é uma proteína multifuncional que desempenha papel em várias atividades não-relacionadas com produção de energia (SIROVER, 2012). Nós mostramos neste trabalho que GAPDH de *T. cruzi* interage com DNA telomérico, o que demonstra que este organismo, que divergiu muito cedo da linhagem eucarionte, apresenta proteínas multifuncionais, sendo GAPDH uma delas. A evolução de proteínas multifuncionais devem representar um mecanismo celular de expandir o repertório genômico. Para um organismo que não apresenta *splicing* alternativo, proteínas multifuncionais podem ser um recurso efetivo para expandir a informação presente no material genético.

O mecanismo de proteção do DNA telomérico de *T. cruzi* é pouco compreendido. Até o momento, somente um gene, codificando para um possível fator ligante do repeat TTAGGG (*repeat-binding factor* - TRF), essencial para proteção do telômero *Trypanosoma brucei* (LI et al., 2005), foi encontrado no banco de dados de *T. cruzi*. Em células de mamíferos, as interações GAPDH-telômero estão envolvidas na manutenção da integridade cromossômica (DEMARSE et al., 2009; SUNDARARAJ et al., 2004). As sequências teloméricas são idênticas entre humanos e tripanossomas e ambas as GAPDHs, de humanos e de tripanossomas, ligam-se a NAD^+ . Assim, é razoável supor que GAPDH desempenhe um papel na proteção do telômero de *T. cruzi*. Esta possibilidade deve ser agora investigada.

Já estabelecido que GAPDH está envolvida em diversas atividades, incluindo metabolismo de ferro, tráfico de membranas, biosíntese de histonas e sinalização celular (SIROVER, 2005; SIROVER, 2012), e portanto apresenta diferentes localizações no espaço intracelular. No caso da translocação para o núcleo, a importação de GAPDH pode ser facilitada por uma interação com uma proteína que contém o sinal de localização nuclear (NLS) (JENSTER et al., 1993). Durante a apoptose, a translocação de GAPDH para o núcleo envolve uma modificação pós-traducional induzida por estresse oxidativo (HARA et al., 2005). O mecanismo que leva GAPDH para o núcleo em *T. cruzi*, no entanto, ainda precisa ser investigado.

Durante o ciclo de vida, o *T. cruzi* alterna-se entre formas replicativas e formas incapazes de se duplicar. Durante este ciclo, o parasita é exposto a diferentes ambientes, distintos quanto a temperatura, fonte de glicose e pH. Como consequência, diferentes estágios do ciclo de vida do *T. cruzi* apresentam vias metabólicas distintas (PAES et al., 2013). O balanço NAD^+/NADH é um importante componente do estado redox da célula, refletindo tanto a atividade metabólica quanto a saúde celular (SCHAFER; BUETTNER, 2001). Nós mostramos aqui que o balanço NAD^+/NADH muda durante o ciclo de vida do *T. cruzi*; esta taxa é similar durante a forma replicativa que vive no inseto – epimastigotas; mas é maior que 1 (isto é, maior concentração de NAD^+ do que de NADH) nas formas não replicativas encontradas no hospedeiro mamífero – tripomastigotas. Mostramos também que GAPDH interage com DNA telomérico em epimastigotas, mas não em tripomastigotas. Como estas formas diferem quanto a capacidade de replicar, é possível que a proteção do telômero seja necessária somente no estágio replicativo.

Para determinar se o balanço NAD^+/NADH controla a interação de GAPDH com telômero, alteramos este balanço tratando epimastigotas e tripomastigotas com NAD^+ ou NADH exógeno. Já foi demonstrado que a adição de NAD^+ exógeno aumenta o nível de NAD^+ intracelular, indicando que o NAD^+ extracelular pode cruzar a membrana plasmática (PITTELLI et al., 2011). De fato, nós mostramos que a adição de NAD^+ exógeno alterou o balanço interno NAD^+/NADH nas células. Trabalhos anteriores mostraram que as taxas NAD^+/NADH citossólicas e nucleares são similares (FULCO et al., 2003; ZHANG et al., 2002). Assim, nós inferimos que o balanço NAD^+/NADH que observamos quando dosamos a concentração intracelular de NAD^+ e de NADH era o balanço nuclear. O balanço NAD^+/NADH foi capaz de modular a interação GAPDH-telômero em ambas as células - epimastigotas e tripomastigotas. Estudos prévios mostraram que tanto a GAPDH quanto a enzima lactato desidrogenase (LDH) pode sentir o estado redox celular e modular a expressão de histonas (DAI et al., 2008, YU et al., 2009), sugerindo uma relação entre o estado redox da célula e a expressão de histonas (HE et al., 2013). Além disto, foi mostrado que o balanço NAD^+/NADH regula a expressão de sirtuinas (GAMBINI et al., 2011). Neste trabalho, mostramos que GAPDH também pode sentir o estado redox da célula, o que pode controlar sua interação com DNA telomérico.

Concluindo, durante seu ciclo de vida o *T. cruzi* apresenta distintos estados redox. Estes estados controlam a interação GAPDH-telômero e esta interação está possivelmente envolvida na proteção das extremidades cromossômicas. A regulação metabólica das redes de sinalização tem sido bastante explorada nos últimos anos (YAFFE; GOUGH, 2013). Como o *T. cruzi* está constantemente exposto a diferentes ambientes, este trabalho apresenta a necessidade de explorar o envolvimento do estado metabólico na fisiologia deste organismo, que são claramente distintas entre as formas evolutivas.

Este trabalho apresentou a busca de novas proteínas que interagem com a proteína Orc1/Cdc6 de *Trypanosoma*, através da identificação em espectrometria de massa. A caracterização realizada por meio de purificações de células transfectadas com o epitopo TAP-tag, nos possibilitou a detecção de uma sequência peptídica que apresenta homologia com uma proteína do complexo de pré-replicação da *Drosophila melanogaster*, chamada de Orc2. Este trabalho mostrou a identificação de um possível componente do complexo ORC em tripanosomas, sugerindo que os tripanosomas, ao igual que os outros eucariontes, podem também apresentar as seis sub-unidades do complexo ORC.

Também se mostra a proteína glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) capaz de interagir com o DNA telomérico em tripanosomas, sugerindo uma possível função não glicolítica igual que nos outros eucariontes. Mas que isto, nossos dados mostraram que esta interação está regulada pelo balanço NAD^+/NADH , indicando a importância do estado metabólico celular na interação do GAPDH – telômero.

REFERÊNCIAS *

- ABDURASHIDOVA, G. et al. Localization of proteins bound to a replication origin of human DNA along the cell cycle. **EMBO Journal**, v.22, p. 4294-4303, 2003.
- ANDREWS, N. W. et al. *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, v.61, p. 1277-1287, 1990.
- BANGS, J. D. et al. Molecular cloning and cellular localization of a BiP homologue in *Trypanosoma brucei*. Divergent ER retention signals in a lower eukaryote. **Journal of Cell Science**, vol. 105, v.4, p. 1101-1113, 1993.
- BARRETT, M. P. et al. The trypanosomiasis. **Lancet Review**, v. 362, p. 1469-1480, 2003.
- BATTHYANY C. et al. Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids *in vivo*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 20450-20463, 2006.
- BELL, S. P.; STILLMAN, B. Nucleotide dependent recognition of chromosomal origins by a multi-protein complex. **Nature**, v.357, p.128-134, 1992.
- BILAUD, T. et al. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. **Nature Genetics**, v. 17, p. 236-239, 1997.
- BLATNIK, M.; THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. Succination of proteins by fumarate: mechanism of inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in diabetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1126, p. 272-275, 2008.
- BLACKBURN, E. H. Structure and function of telomeres. **Nature**, v. 350, p. 569-573, 1991.
- BLACKBURN, E. H., Telomere states and cell fates. **Nature**, v. 408, p.53-56, 2000.
- BLACKBURN, E. H. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. **FEBS Letters**, v. 579, p. 859-862, 2005.
- BLACKBURN, E. H.; CHALLONER, P. B. Identification of a telomeric DNA sequence in *Trypanosoma brucei*. **Cell**, v. 36, p. 447-457, 1984.
- BROWN, V. M. et al. A novel CRM1-mediated nuclear export signal governs nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase following genotoxic stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 5984-5992, 2004.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CALDERANO, S. G.; GODOY P. D.; DA CUNHA, J. P.; ELIAS, M. C. Trypanosome prereplication machinery: a potential new target for an old problem. **Enzyme Research**, v.2011, p. 518258, 2011.

CANO, M. I. et al. A *Trypanosoma brucei* protein complex that binds G-overhangs and copurifies with telomerase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 896-906, 2002.

CANE, D. E.; SOHNG, J-K. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by pentalenolactone. 2. Identification of the site of alkylation by tetrahydro-pentalenolactone. **Biochemistry**, v. 33, p. 6524-6530, 1994.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002.

DA CUNHA J.P. et al. Post-translational modifications of *Trypanosoma cruzi* histone H4. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 150, p. 268-277, 2006.

DAI, R. P. et al. Histone 2b (H2B) expression is confined to a proper NAD⁺/NADH redox status. The **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 26894-26901, 2008.

DANG, H. Q.; LI, Z. The Cdc45/Mcm2-7/GINS complex in trypanosomes regulates DNA replication and interacts with two Orc1-like proteins in the origin recognition complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 32424-32435, 2011.

DELANO WL, PYMOL MOLECULAR GRAPHICS SYSTEM Version 1.7. Disponível em: <<http://www.pymol.org>>. Acesso em: 19 nov. 2013.

DE LANGE, T. Protection of mammalian telomeres. **Oncogene**, v. 21, p. 532-540, 2002.

DE LANGE, T. T-loops and the origin of telomeres. **Nature Review Molecular Cells Biology**, v. 5, p. 323-329, 2004.

DE LANGE, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. **Genes Development**, v. 9, p. 2100-2110, 2005.

DEMARSE, N. A. et al. Direct binding of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase to telomeric DNA protects telomeres against chemotherapy-induced rapid degradation. **Journal Molecular Biology**, v. 11, p. 789-803, 2009.

DE SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: Andrade, Z.; Brener, Z.; Barral, M. (eds). *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 75-86. 1999.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 269-285, 2002.

DE SOUZA, W. Novel cell biology of *Trypanosoma cruzi*. In: Tyler, K. M.; Miles, M. A. (eds). American Trypanosomiasis. **Springer US**, p. 13-24, 2003.

DIMITRIEV, P. V.; PETROV, A. V.; DONTSOVA, O. A. Yeast telosome complex: components and their functions. **Biochemistry (Mosc.)**, v. 8, p. 718-734, 2003.

DUTTA, A.; BELL, S. P. Initiation of DNA replication in eukaryotic cells. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 13, p. 293-332, 1997.

ELIAS, M. C. et al. Chromosome localization changes in the *T. cruzi* nucleus. **Eukaryotic Cell**, v. 1, p. 914-953, 2002.

FERSHT, A. R. On the simulation of protein folding by short time scale molecular dynamics and distributed computing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 14122-14125, 2002.

FORSBURG, S.L. Eukaryotic MCM proteins: Beyond replication initiation. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 68, p. 109-131, 2004.

FUJITA, M. Cdt1 revisited: complex and tight regulation during the cell cycle and consequences of deregulation in mammalian cells. **Cell Division**, v. 1, p. 22, 2006.

FULCO, M. Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. **Molecular Cell**, v. 12, p. 51-62, 2003.

GILBERT F. Chromosome 6. **Genetic Testing**, v. 6, p. 341-358, 2002.

GLASER, P. E.; HAN, X.; GROSS, R. W. Tubulin is the endogenous inhibitor of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoform that catalyzes membrane fusion: Implications for the coordinated regulation of glycolysis and membrane fusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 14104-14109, 2002.

GODOY, P. D. et al. Trypanosome pre replication machinery contains a single functional *orc1/cdc6* protein, which is typical of *Archaea*. **Eukaryotic Cells**, v. 10, p. 1592-603, 2009.

GOSSEN, M. et al. A *Drosophila* homolog of the yeast origin recognition complex. **Science**, v. 270, p. 1674-1677, 1995.

GRAINGE, I.; SCAIFE, S.; WIGLEY, D. B. Biochemical analysis of components of the pre-replication complex of *Archaeoglobus fulgidus*. **Nucleic acids research**, v. 31, p. 4888-4898, 2003.

GREIDER, C. W.; BLACKBURN, E. H. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. **Cell**, v. 51, p. 887-898, 1987.

GREIDER, C. W., & BLACKBURN, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. **Cell**, 43(2), 405-413, 1985.

GUIDO, R. V. et al. Kinetic and Crystallographic Studies on Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* in Complex with Iodoacetate. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 6, p. 210-214, 2009.

HANNAERT, V. et al. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. **Kinetoplastid Biological Discovered.**, v. 2, p. 11, 2003.

HARA, M. R. et al. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. **Nature Cell Biology**, v. 7, p. 665-674, 2005.

HARA, M. R. et al. GAPDH as a sensor of NO stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1762, p. 502-509, 2006.

HE, H. et al. Integration of the metabolic/redox state, histone gene switching, DNA replication and S-phase progression by moonlighting metabolic enzymes. **Bioscience report**, v. 33, p. 187-197, 2013.

HUITOREL, P.; PANTALONI, D. Bundling of microtubules by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its modulation by ATP. **European Journal of Biochemistry**, v. 150, p. 265-269, 1985.

HUPPERT, J. L. Structure, location and interactions of G-quadruplexes. **FEBS Journal**, v. 277, p. 3452-3458, 2010.

ISHITANI, R. et al. Nuclear localization of overexpressed glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cultured cerebellar neurons undergoing apoptosis. **Molecular Pharmacology**, v. 53 p. 701-707, 1998.

JENSTER, G.; TRAPMAN, J.; BRINKMANN, A. O. Nuclear import of the human androgen receptor. **The Biochemical Journal**, v. 293, p. 761- 768, 1993.

JUNQUEIRA, A. C. V.; DEGRAVE, W.; BRANDÃO, A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 270-272, 2005.

KELLY, T. J.; BROWN, G. W. Regulation of chromosome replication. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 829-880, 2000.

KENNEDY, P. G. E. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 496-504, 2004.

KOLLIEN, A., SCHAUB, G. The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. **Parasitology Today**, v. 16, p. 381-387, 2000.

KORNBERG M. D. et al. GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins. **Nature Cell Biology**, v. 12, p. 1094-1100, 2010.

KURENOVA, E. V., MASON, J. M. Telomere functions. A review. **Biochemistry (Mosc)**, v. 62, p. 1242-1253, 1997.

LANDENBURGER, E. M.; KELLER, C.; KNIPPERS, R. Identification of a binding region for human origin recognition complex proteins 1 and 2 that coincides with an origin of DNA replication. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, p. 36-48, 2002.

- LAXMAN, S.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide signaling mechanisms in trypanosomes: possible targets for therapeutic agents. **Molecular Interventions**, v. 7, p. 203, 2007.
- LI, B; ESPINAL, A; CROSS, G. A. M. Trypanosome telomeres are protected by a homologue of mammalian TRF2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, p. 5011-5021, 2005.
- LITMAN, F. R.; CHANG, S.; ZOU, L. RPA and POT1: Friends or foes at telomeres?. **Cell Cycle**, v. 11, p. 4, 2012.
- LUKES, J. et al. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. **Eukaryot. Cell**, v. 1, p. 495-502, 2002.
- LUNDGREN M.; BERNANDER R. Archaeal cell cycle progress. **Current Opinion Microbiology**, v. 8, p. 662-668, 2005.
- MENDEZ, J.; STILLMAN, B. Perpetuating the double helix: molecular machines at eukaryotic DNA replication origins. **Bioessays**, v. 25, p. 1158-1167, 2003.
- MITSUZAWA, H. et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and actin associate with RNA polymerase II and interact with its Rpb7 subunit. **FEBS letters**, v. 579, p. 48-52, 2005.
- MIYOSHI, T. et al. Fission yeast Pot1-Tpp1 protects telomeres and regulates telomere length. **Science**, v. 320, p. 1341-1344, 2008.
- MOHR, S.; STAMLER, J. S.; BRÜNE, B. Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 4209-4214, 1996.
- MUNOZ-JORDAN, J. L. et al. T-loops at trypanosome telomeres. **EMBO Journal**, v. 20, p. 579-588, 2001.
- MURTI, K. G.; PRESCOTT, D. M. Telomeres of polytene chromosomes in a ciliated protozoan terminate in duplex DNA loops. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 14436-14439, 1999.
- NAKAGAWA, T. et al. Participation of a fusogenic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in nuclear membrane assembly. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 20395-20404, 2003.
- NEWLON, C. S. DNA replication in yeast. DNA replication in eukaryotic cells. **Cold Spring Harbor Laboratory Press-Plainview**, v.1, p. 873-914, 1996.
- OGANESIAN, L.; BRYAN, T. M. Physiological relevance of telomeric G-quadruplex formation: a potential drug target. **Bioessays**, v. 29(2), p. 155-165, 2007.
- O'SULLIVAN, R. J., & KARLSEDER, J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 11(3), 171-181, 2010.
- PAES, L. S. Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **PloS One**, v. 8, p. 1-13, 2013.

PALM, W.; DE LANGE, T. How shelterin protect mammalian telomeres. **Annual Reviews**, v.42, p. 301-334, 2008.

PARK, J. et al. O-GlcNAcylation disrupts glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homotetramer formation and mediates its nuclear translocation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p. 254-262, 2009.

PITELLI, M. et al. Pharmacological effects of exogenous NAD on mitochondrial bioenergetics, DNA repair, and apoptosis. **Molecular Pharmacology**, v. 80, p. 1136-1146, 2011.

PORTO-CARREIRO, I. et al. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. **European Journal of Cell Biology**, v. 79, p. 858-869, 2000.

ROBINSON, N. P.; BELL, S. D. Origins of DNA replication in the three domains of life. **FEBS Journal**, v. 272, p. 3757-3766, 2005.

ROWLES A.; TADA S.; BLOW J. J. Changes in association of the *Xenopus* origin recognition complex with chromatin on licensing of replication origins. **Journal of Cells Science**. v. 112, p. 2011-2018, 1999.

SEN, N. et al. Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis. **Nature Cell Biology**, v. 10, p. 866-873, 2008.

SCHENKMAN, S.; EICHENGER, D.; PEREIRA, M. E. A. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. **Annual Review Microbiology**, v. 48, p. 499-523, 1994.

SCHAFER, F.; BUETTNER, G. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, p. 1191-1212, 2001.

SHECTHTER, D. F.; YING, C. Y.; GAUTIER, J. The intrinsic DNA helicase activity of *Methanobacterium thermoautotrophicum* delta H minichromosome maintenance protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275 p. 15049-15059, 2000.

SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the optimal path. **Protein Engineering**, v. 11, p. 739-747, 1998.

SINGH, R.; GREEN, M. R. Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Science**, v. 259, p. 365-368, 1993.

SILBER, A. M. et al. Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 168, p. 102-108, 2009.

SIROVER, M. A. New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 95, p. 45-52, 2005.

SIROVER, M. A. Subcellular dynamics of multifunctional protein regulation: Mechanisms of GAPDH intracellular translocation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, p. 2193-2120, 2012.

SMOGORZEWSKA, A.; DE LANGE, T. Regulation of telomerase by telomere. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, p. 177-208, 2004.

SOUZA, J. M.; RADI, R. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 360, p. 187-194, 1998.

SPECK, C. et al. ATPase-dependent cooperative binding of ORC and Cdc6 to origin DNA. **Nature. Structural & Molecular Biology**, v. 12, p. 965–971, 2005.

SUNDARARAJ, K. P. et al. Rapid Shortening of telomere length in response to ceramide involves the inhibition of telomere binding activity of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 6152-6162, 2004.

THEIS, J. F.; NEWLON, C. S. Two compound replication origins in *Saccharomyces cerevisiae* contain redundant origin recognition complex binding sites. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, p. 2790-2801, 2001.

THOMPSON, J. D.; et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

TIENGWE, C. et al. Genome-wide Analysis Reveals Extensive Functional Interaction between DNA Replication Initiation and Transcription in the Genome of *Trypanosoma brucei*. **Cell Reports**, v. 2, p. 185-197, 2012.

TRISTAN, C. et al. The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments. **Cellular Signalling**, v. 23, p. 317-323, 2011.

WOESE, C. R; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5088-5090, 1977.

WRIGHT, W. E.; PEREIRA-SMITH, O. M.; SNAY, J. W. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. **Molecular of Cells Biology**, v. 9, p. 3088-3092, 1989.

WU, L. et al. POT1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres. **Cell**, v. 126, p. 49-62, 2006.

YAFFE, M. B.; GOUGH, N. R. 2012: Signaling breakthroughs of the year. **Science Signaling**, v. 6, p. 256, 2013.

YU, F. X. et al. Logic of a mammalian metabolic cycle: an oscillated NAD^+/NADH redox signaling regulates coordinated histone expression and S-phase progression. **Cell Cycle**, v. 8, p. 773-779, 2009.

ZHANG, R.; ZHANG, C. T. Single replication origin of the archaeon *Methanosarcina mazei* revealed by the Z curve method. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 297, p. 396-400, 2002.

ZHANG, Q.; PISTON, D. W.; GOODMAN, R. H. Regulation of corepressor function by nuclear NADH. **Science**, v. 295, p. 1895-1897, 2002.

ZHAO, Y. et al. Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells. **Cell**, v. 138, p. 463-475, 2009.

ZHENG, L.; ROEDER, R. G.; LUO, Y. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a co-activator complex that contains GAPDH as a key component. **Cell**, v. 114, p. 255-266, 2003.