# LOYZE PAOLA OLIVEIRA DE LIMA Análise de interatores da proteína Orc1/Cdc6 de *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Programa de Pósgraduação 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 2019

## LOYZE PAOLA OLIVEIRA DE LIMA

#### Análise de interatores da proteína Orc1/Cdc6 de Trypanosoma cruzi

Tese apresentada ao Programa de Pósgraduação 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 Quartim Barbosa Elias Sabbaga

Versão Original

São Paulo 2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Paola Oliveira de Lima, Loyze Análise de interatores da proteína Orc1/Cdc6 de TRYPANOSOMA CRUZI / Loyze Paola Oliveira de Lima; orientadora Maria Carolina Quartim Barbosa Elias Sabbaga. -- São Paulo, 2019. 101 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Trypanosoma cruzi. 2. Replicação de DNA. 3. Orcl/Cdc6. 4. DNA Polimerase Theta. I. Quartim Barbosa Elias Sabbaga, Maria Carolina, orientador. II. Título. Candidato(a): Loyze Paola Oliveira de Lima

Título da Tese: Análise de interatores da proteína Orc1/Cdc6 de *Trypanosoma* cruzi

Orientador(a): Prof.(a) Dr(a) Maria Carolina Quartim Barbosa Elias Sabbaga A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado em sessão pública realizada a \_\_ / \_\_ / \_\_, considerou o(a) candidato(a):

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

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

Examinado(a): Assinatura:
Nome:
nstituição:

Examinado(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
nstituição:



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 : 11 - 3091.7733 - telefax : 11 3091.8408 e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

#### CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 673/14 referente ao projeto intitulado "Análise de Modificações Pós-Traducionais da Proteína Orc1/Cdc6 Durante o Ciclo de Vida de Trypanosoma cruzi. Possível Envolvimento destas com a Ausência de Interação Orc1/Cdc6-DNA nas Formas Não Replicativas," sob responsabilidade de Loyze Paola Oliveira de Lima, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSII - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 25 de junho de 2014.

~ L'Ilin Photo DR WARLESS 1 (VARUS DE LISTA Coordenador Level UX (10B-1 SP

Coordenador da CEPsh - ICB - USP

Em memória do meu pai Osmar de Lima

#### AGRADECIMENTOS

Ao meu querido pai Osmar de Lima, que sempre me incentivou e cuidou de mim. Eu sentirei a falta do meu paizinho eternamente, e tudo o que conquistei devo a ele que sempre ficou feliz com minhas conquistas e sempre me ajudou em todos os momentos da minha vida. Essa tese foi construída graças ao meu pai que nunca me deixou desistir. Eu sempre te amarei Capitão Fantástico.

À minha mãe Helena, por cuidar de mim, por todas nossas conversas diárias, por todo amor que depositou em mim durante toda minha vida, obrigada mãe por ser a minha melhor amiga.

Ao meu sobrinho Samuel por ser o amor da minha vida, por ser a criança mais doce e amorosa, por todas as brincadeiras e todos os momentos que passei ao lado desse neném.

Agradeço a minha família, aos meus irmãos Osmar e Lyza, meus cunhados Sidnei e Aline, meus sobrinhos Luidi e Davi, e minha vó Marta, por serem pessoas que contribuíram em diversos momentos da minha vida, muitas vezes me ajudando apenas com a presença em minha vida.

À minha orientadora Carolina Elias, obrigada por me ensinar tanto, por acreditar em mim, por toda a paciência em momentos em que eu não aguentava mais. Agradeço muito a sua presença em minha vida. Carolina, a sua humanidade é um exemplo no meio acadêmico, nos momentos mais difíceis da minha vida você acreditou que eu conseguiria superar e ajudou a me estabelecer. Seu apoio foi além do profissional, e eu nunca vou esquecer sua presença na minha vida. Obrigada por ser inspiração.

Agradeço aos meus dois amores Lola e Lucy, por todo amor incondicional, pela companhia durante a escrita dessa tese, por estarem sempre ali dormindo perto de mim e enchendo meu coração de amor. Aos meus queridos Nobu, Pucca, Bingo, Spock e Gary, vocês são incríveis e merecem todo meu amor e carinho.

Aos meus amigos Pedro Rodrigues e Bruno M Di Genova por todas as conversas e por aguentar meus desabafos, vocês são incríveis e eu amo vocês.

Agradeço também ao Matheus Gonçalves, pelo nosso clube do livro, pelas nossas conversas, por todas as vezes que pedimos delivery e ficamos em casa fazendo máscara facial e/ou vendo filmes. Obrigada por não desistir de mim nessa reta final, eu amo você do fundo do meu coração. Agradeço a minha querida amiga Simone G Calderano, por todas as nossas conversas de café da manhã, por seu apoio nos momentos mais difíceis da minha vida. Obrigada por não desistir de mim e por me fazer uma pessoa melhor, obrigada por toda ajuda no trabalho e por me fazer crescer pessoalmente e profissionalmente.

À minha amiga querida Teresa C de Jesus, por nunca me esquecer e sempre ter as melhores conversas. Teresa, você é um anjinho na minha vida, obrigada por existir nesse mundo.

Agradeço a todos os colegas do LECC e LETA. Agradeço principalmente a Carla por tudo que me ensinou e por ter me ajudado tanto quando mais precisei, ao Marcelo por ensinar tanto e por ser tão paciente com todo mundo, a Marcela por ser a pessoa mais fofa do mundo, sua presença no lab é essencial, a Paula por ser um exemplo de dedicação e cuidado, ao Raphael por ser a pessoa mais legal do mundo e um dos mais geniais, ao André e a Julia por serem tão pacientes e empolgados com a pesquisa.

À pesquisadora Julia Cunha por todas as conversas, por confiar em mim para colaborar com seu trabalho, por me ensinar muita coisa e por ser inspiração em minha vida.

À toda equipe do laboratório, aos técnicos Karin, Ivan, Rosa, Ismael e Eliana por todo trabalho para manter esse laboratório funcionando perfeitamente. À Mariana Morone por ser tão competente e a melhor pessoa do mundo. Agradeço a Dona Lídia por ser uma grande profissional e por ser uma ótima pessoa na nossa convivência quase diária. Agradeço a todas as pessoas que administram esse laboratório, a Leda, Dona Cida e Sueli. Agradeço profundamente a Leila, por todas as conversas, por toda ajuda no trabalho e fora dele, você Leila é um ser de luz.

Aos colaboradores desse trabalho: Simone Calderano, Marcelo da Silva, Christiane Araujo, Elton Vasconcelos, Leo Iwai, Claudio Pereira e Stenio Fragoso, vocês foram essenciais para a construção desse trabalho.

Agradeço ao Programa de pós-gradução e a USP, e principalmento a Silvia F Camargo, por ser uma excelente profissional e por ter me ajudado tanto durante todo o período do doutorado.

Ao Cetics e ao apoio financeiro da FAPESP, CAPES e CNPq.

#### RESUMO

De Lima, LP. Análise de interatores da proteína Orc1/Cdc6 de *Trypanosoma cruzi.* 2019. [Tese (Doutorado em ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

Aproximadamente dez milhões de pessoas, predominantemente na América Latina, são acometidas pela doença de Chagas, causada pelo Trypanosoma cruzi. Apesar disso, essa enfermidade apresenta investimentos reduzidos em pesquisas e produção de medicamentos. As drogas atualmente disponíveis para tratar essa doença têm efeitos tóxicos e não são eficazes contra todas as fases da doença ou cepas de parasitas, tornando necessário estudos que apresentem alvos terapêuticos específicos. Nesse contexto, nosso laboratório estuda a replicação do DNA em Trypanosoma, uma vez que caracterizar a replicação deste parasita pode servir como uma ferramenta para buscar possíveis alvos terapêuticos. Neste estudo, investigamos o papel da proteína DNA Polimerase theta-domínio helicase (Pol0-helicase) na replicação do T. cruzi. A DNA polimerase theta (Pol0) de eucariontes recentes é um membro da família de polimerase e exibe um domínio C-terminal da polimerase, um domínio central e um domínio de helicase N-terminal. A proteína Polo desempenha importantes papéis no reparo do DNA através de seu domínio polimerase, regulando a integridade do genoma. Além disso, em mamíferos, a Polo modula o tempo de disparo da origem e o recrutamento da helicase MCM para a cromatina. Em contraste, o genoma de T. cruzi exibe dois ortólogos putativos individuais de Polo em diferentes locos do genoma; um homólogo ao domínio da polimerase do terminal C de Pol
e e o outro hom
ologo ao dom
ínio da helicase, denominado pull-down usando o componente T. cruzi do complexo de pré-replicação Orc1/Cdc6 como isca capturou Pol0-helicase do extrato nuclear. Orc1/Cdc6 e Pol0-helicase interagiram diretamente e a Pol0-helicase recombinante apresentou atividade de desenrolamento do DNA e de ATPase. Além disso, uma cepa de T. cruzi superexpressando o domínio Polo-helicase exibiu uma quantidade significativamente menor de MCM7 ligado ao DNA e prejudicou o disparo na origem da replicação. Utilizamos a metodologia de CRISPR-Cas9 para gerar uma linhagem que expressa a Polo-helicase sem o domínio de helicase, observamos que essa linhagem, de fato, apresentou mais MCM no DNA. Em conjunto, esses dados sugerem que a Polθ-helicase modula a replicação do DNA interagindo diretamente com Orc1/Cdc6, o que reduz a ligação do MCM7 ao DNA e, assim, prejudica o disparo das origens de replicação.

**Palavras-chave:** Trypanosoma cruzi. Replicação do DNA. Orc1/Cdc6. DNA polimerase theta.

#### ABSTRACT

Analysis of the interactors of the Orc1 / Cdc6 protein of *Trypanosoma cruzi*. 2019. [Thesis (Ph. D. Thesis in Science)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

Approximately 10 million people, predominantly in Latin America, are affected by Chagas' disease, caused by Trypanosoma cruzi. Despite this, we observe a reduced investment in research and production of new drugs against this parasite. Drugs available to treat this disease have toxic effects and are not effective against all stages of the disease or strains of parasites. Therefore, studies that have specific therapeutic targets are important and necessary. In this context, our laboratory studies DNA replication in Trypanosoma, since components acting in the replication of this parasite can be viewed as therapeutic targets. In this study, we investigated the role of the protein DNA polymerase theta – helicase domain (Pol0-helicase) in T. cruzi DNA replication. DNA polymerase theta (Pol $\theta$ ) from recent eukaryotes is a member of the polymerase family and exhibits a polymerase C-terminal domain, a central domain and a helicase N-terminal domain. The Pol0 protein plays important roles in DNA repair, regulating the integrity of the genome. In addition, in mammals, Pol0 modulates the replication origin firing and recruitment of the MCM helicase to the chromatin. In contrast, the T. cruzi genome exhibits two individual putative orthologues of Pol0 in different loci of the genome; a polymerase domain homolog of the Cterminal of Pol0 and a homologous to the helicase domain, designated Pol0polymerase and Polθ-helicase, respectively. In this study, a pull-down assay using the T. cruzi component of the prereplication complex Orc1/Cdc6 as bait captured Pol0-helicase from the nuclear extract. Orc1/Cdc6 and Pol0-helicase directly interacted, and Pol0-helicase presented DNA unwinding and ATPase activities. T. cruzi strain overexpressing the Pol0-helicase domain exhibited a significantly decreased amount of DNA-bound MCM7 and impaired replication origin firing. Taken together, these data suggest that Pol0-helicase modulates DNA replication by directly interacting with Orc1/Cdc6, reducing the binding of MCM7 to DNA and thereby impairs the firing of replication origins.

**Key-words:** Trypanosoma cruzi. DNA replication. Orc1/Cdc6. DNA polymerase theta.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 F	Rotas de migração da América Latina e estimativa do número total
de indivíduos	s infectados em países não endêmicos 19
Figura <b>1.</b> 2. F	Representação esquemática do ciclo celular de células de
mamíferos	
Figura 1.3. N	Montagem do complexo de pré replicação 23
Figura 1.4. E	Esquema da forquilha de replicação eucariótica e polimerases
replicativas.	
Figura 1.5. C	Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi
Figura 1.6. F	Representação esquemática das alterações morfológicas do ciclo
celular do ep	imastigota
Figura 1.7. A	A maquinaria de pré-replicação de tripanossomatídeos
Figura 3.1. C	Clonagem de POL0-helicase no vetor pDONR 221Plataforma
GATEWAY	
Figura 3.2. F	Recombinação do vetor de entrada pDONR 221_Pol0-helicase com
os vetores de	e destino 45
Figura 4.1. E	Expressão e purificação da proteína recombinante rTcOrc1/Cdc6-
6XHIS	
Figura 4.2. E	Extrato Nuclear enriquecido59
Figura 4.3. F	Pull down utilizando a proteína rTcOrc1/Cdc6 como isca
Figura 4.4. F	Representação esquemática da proteína DNA polimerase theta em
diferentes eu	cariotos63
Figura 4.5. E	Expressão e purificação da proteína recombinante TcPol θ-
helicase-6XF	IIS e obtenção de anti- TcPolθ-helicase64
Figura 4.6. E	Expressão e purificação da proteína rTcPol θ-polimerase-6XHIS. 65
Figura 4.7. F	Pull down utilizando a proteína rTcPolθ-helicase como isca66
Figura 4.8. E	Ensaio de ligação entre as proteínas rTcPolθ-helicase e
rTcOrc1/Cdc	6
Figura 4.9. F	Representação dos domínios conservados de Pol θ69
Figura 4.10.A	A atividade de rTcPolθ-helicase é potencializada na presença de
DNA simples	s fita70
Figura 4.11.	rTcPolθ-helicase possui atividade de helicase dependente de ATP.

Figura 4.12. Análise da atividade de helicase da rTcPolθ-helicase_mutada74	1
Figura 4.13. Localização de TcPolθ-helicase durante o ciclo celular do parasita.	
	7
Figura 4.14. Análise da superexpressão da proteína Polθ-helicase	3
Figura 4.15. A surprexpressão de Polθ-helicase afeta a replicação do parasita.	
	9
Figura 4.16. Células superexpressando Pol0-helicase interfere no recrutamento	)
de Mcm-7 ao DNA81	1
Figura 4.17. Deleção do domínio helicase de TcPolθ-helicase interfere no	
recrutamento de Mcm-7 ao DNA e na replicação do parasita83	3
Figura 4.18. Representação esquemática da deleção do gene de Pol0-helicase	
utilizando a técnica de CRISPR85	5
Figura 4.19. Deleção parcial de TcPolθ-helicase86	3
Figura 4.20. A superexpressão de Polθ-helicase diminui o número de origens	
disparadas e a velocidade da forquilha89	9

## LISTA DE TABELAS

Tabela	1.1	Superfamília	de	helicases,	principais	características	е
represer	ntantes	s. 27					
Tabela 1	.2. Su	bdivisões da SI	-2 de	helicases			28
Tabela 1	.3. A c	divisão das fam	ílias c	de DNA polim	nerases		29

# SUMÁRIO

1. INT	RODUÇÃO	18
1.1.	Ciclo Celular	20
1.2.	Replicação DNA	21
1.3.	Complexo de Pré-Replicação	22
1.4.	Complexo de replicação	24
1.5.	Helicases	25
1.5.	1. Superfamília II de Helicases	27
1.6.	DNA polimerases	28
1.7.	DNA polimerase θ	29
1.7.	1. Função celular de Polθ	30
1.7.	2. Domínio Helicase de DNA polimerase θ	31
1.8.	Trypanosoma cruzi	32
1.8.	1. Ciclo de vida	32
1.8.	2. Ciclo celular em <i>T. cruzi</i>	33
1.8.	3. Replicação do DNA em Tripanosomatídeos	34
2. OB	JETIVOS	37
2.1.	Objetivo geral	37
2.2.	Objetivos específicos	37
3. MA	TERIAS E MÉTODOS	38
3.1.	Ensaios envolvendo o uso de epimastigotas	38
3.1.	1. Cultura de Epimastigotas	38
3.1.	2. Curva de crescimento	38
3.1.	3. Ensaio de Sincronização	38
3.1.	4. Fracionamento celular	39
3.1.	5. Análise por western blotting	39
3.1.	6. Citometria de fluxo	40
3.1.	7. Ensaios de incorporação de EdU	40
3.1.	8. Imunofluorescência	41
3.1.	9. DNA combing	41
3.2.	Obtenção de linhagens geneticamente modificadas	43
3.2.	<ol> <li>Obtenção de linhagens superexpressoras utilizando o sistema Gateway 43</li> </ol>	®
3.2.	2. Obtenção de linhagens utilizando a técnica de CRISPR	46
3.3.	Obtenção de proteínas recombinantes	48
3.3.	1. Extração DNA genômico	48

3.3.2.	PCR	Э
3.3.3.	PCR de colônia49	Э
3.3.4.	Clonagem pGEM-T49	Э
3.3.5.	Construção no vetor de expressão pET28-a50	C
3.3.6.	Expressão	C
3.3.7.	Lise	C
3.3.8.	Purificação5	1
3.4. Ens	aios utilizando proteínas recombinantes5	1
3.4.1.	Análise de espectrometria de massa e pull down52	1
3.4.2.	Ensaios de ligação53	3
3.4.3.	Ensaio de atividade de Helicase53	3
3.4.4.	Ensaio de atividade de ATPase55	5
3.5. Cor	nstrução da proteína recombinante com TcPol θ-helicase mutada55	5
3.5.1.	Análise da estrutura do domínio helicase da DNA polimerase $\theta$ 55	5
3.5.2.	Overlap PCR	5
4. RESUL	<b>TADOS</b>	7
4.1. Bus	ca de interatores de TcOrc1/Cdc65	7
4.1.1.	Obtenção da proteína TcOrc1/Cdc6-6XHIS5	7
4.1.2.	Extrato enriquecido de conteúdo nuclear58	3
4.1.3.	Pull down utilizando a proteína rTcOrc1/Cdc6-6XHIS como isca	Э
4.1.4.	Análise de bioinformática60	C
4.1.5.	Obtenção da proteína rTcPolθ-helicase-6XHIS63	3
4.1.6.	Obtenção da proteína rTcPolθ-polimerase-6XHIS64	4
4.1.7.	<i>Pull down</i> utilizando a proteína rTcPolθ-helicase-6XHIS como isca69	5
4.1.8.	Ensaio de ligação de rTcOrc1/Cdc6-MBP com rTcPol0-helicase-6XHIS 6	5
4.2. Car	racterização de TcPolθ-helicase	3
4.2.1. polimera	Domínios conservados nas proteínas ΤcΡolθ-helicase e TcΡolθ- ase68	3
4.2.2. ssDNA	Verificação da atividade de ATPase de rTcPol θ-helicase na presença de 70	;
4.2.3.	Ensaio de helicase	1
4.3. Aná	alise funcional de TcPolθ-helicase74	1
4.3.1.	Localização celular de TcPol0-helicase7	5
4.3.2.	Análise da superexpressão de TcPolθ-helicase78	3
4.3.3. ΤcΡolθ-	Monitoramento da replicação das linhagens superexpressoras de helicase	8

7.	<b>REFERÊNCIAS</b>			
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS			
5.	DISCUS	SÃO	. 90	
	4.3.7. linhager	Monitoramento do disparo de origens e velocidade da replicação na n superexpressora de Polθ-helicase	. 87	
	4.3.6. helicase	Monitoramento da replicação em células com deleção parcial de Polθ- 84		
	4.3.5. Polθ-hel	Análise do recrutamento de MCM em células sem o domínio helicase o icase	de . 82	
	4.3.4. de prote	Envolvimento da superexpressão de TcPolθ-helicase no carregamento ínas do complexo de pré-replicação durante as fases do ciclo celular	) . 80	

#### 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma das doenças tropicais negligenciadas listadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS)<sup>1</sup>. As doenças negligenciadas prevalecem em países tropicais e subtropicais e, como geralmente afetam pessoas com menor status socioeconômico, não são um empreendimento lucrativo para a indústria farmacêutica. A doença de Chagas foi descoberta e descrita em 1909, pelo médico brasileiro Carlos Chagas e é causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), um protozoário hemoflagelado da ordem Kinetoplastida e da família Trypanosomatidae<sup>2</sup>.

Clinicamente, a doença de Chagas tem duas fases: uma fase inicial aguda com duração de algumas semanas, caracterizada por febre e muitos parasitas circulantes na corrente sanguínea, e a fase crônica que pode ser classificada como indeterminada e determinada. A forma indeterminada é caracterizada por um estado febril e poucos parasitas na corrente sanguínea e a forma determinada manifesta-se com alterações cardíacas (cardiopatia chagásica), digestivas (megacólon e megaesôfago) e alterações neurológicas significativas<sup>2</sup>.

A OMS estima que aproximadamente 8 milhões de pessoas estejam infectadas com *T. cruzi* em todo o mundo, com quase 100 milhões em risco de infecção; além disso, 2000 mortes por ano podem ser atribuídas à doença de Chagas, tornando esta doença um sério problema de saúde pública<sup>1</sup>.

Além disso, a Associação Pan-Americana de Saúde descreveu a geografia endêmica de doença de chagas como a área localizada entre o sul dos Estados Unidos e o sul da Argentina e do Chile, o que inclui 21 países. Existem diferenças importantes entre a prevalência da doença de Chagas entre os países endêmicos, com a Bolívia sendo o país com maior prevalência estimada variando entre 6,8% e 18% da população seropositiva para *T. cruzi*. Embora o Brasil (1,0%) e o México (1%) tenham uma das mais baixas prevalências da região, junto com a Argentina (4,1%), abrigam mais da metade da população infectada na América Latina<sup>3</sup>.

Apesar da doença de Chagas ser endêmica na América Latina, os padrões de migração globalizaram a doença, que já apresenta casos relatados na Europa, nos Estados Unidos, no Japão e na Austrália. Nos Estados Unidos, estima-se que cerca de 300.000 pessoas estejam infectadas, embora alguns

estudos relatem mais de 250.000 casos no Texas e um milhão ou mais de casos em todo o país. Na Europa, estima-se que cerca de 45.000 a 67.000 casos de chagas estejam presentes na Espanha, com mais de 100.000 casos em todo o continente <sup>3; 4</sup>(Figura 1.1).



Figura 1.1 Rotas de migração da América Latina e estimativa do número total de indivíduos infectados em países não endêmicos.

Retirado de Coura-Rodrigues e Albajar-Vinas (2010).<sup>4</sup>

A terapia atual para a doença de Chagas é limitada a drogas como o nifurtimox e o benzonidazol, que são eficazes no tratamento apenas da fase aguda da doença. Além disso, vários efeitos colaterais, desde hipersensibilidade à depressão da medula óssea e polineuropatia periférica, foram associados a esses medicamentos. Portanto, o desafio atual é encontrar novos medicamentos eficazes e seguros contra a doença de Chagas<sup>5</sup>.

Nosso laboratório estuda a replicação do DNA em Trypanosoma. Estes organismos, agentes etiológicos da doença de Chagas (*T. cruzi*) e da doença do sono (*T. brucei*), divergiram precocemente durante a evolução dos eucariotos e apresentam relevância como modelos para estudos genéticos, evolutivos e comparativos. Além disto, caracterizar a replicação deste parasita pode servir como uma ferramenta para buscar possíveis alvos terapêuticos.

A replicação do DNA, que ocorre na fase S do ciclo celular, está didaticamente dividida nas etapas de iniciação, alongamento e término e é um processo fundamental para a sobrevivência do parasita. Portanto, as proteínas

envolvidas nesse processo precisam ser vistas como alvos potenciais para o desenvolvimento de drogas. As proteínas que atuam na etapa de alongamento são bem conservadas entre os eucariontes, o que deve dificultar o desenvolvimento de drogas especificamente contra tripanossomatídeos sem causar danos às células do hospedeiro. Já as proteínas envolvidas na iniciação da replicação de tripanosomatídeos têm se mostrado altamente divergentes em relação a outras encontradas em eucariotos modelo, tornando essas diferenças um alvo a ser explorado. Por esta razão, este trabalho explorou mecanismos moleculares envolvidos no processo de início de replicação em *T. cruzi*.

#### 1.1. Ciclo Celular

O ciclo celular é a série de eventos que leva à duplicação e divisão de uma célula. A duplicação e a transmissão precisas de informações genéticas idênticas nas células descendentes estão no centro de um ciclo de divisão celular.

O ciclo celular envolve uma série de eventos sequenciais e é dividido nas fases G1, fase S, G2, mitose e citocinese<sup>6</sup> (Figura 1.2).

A fase G1 refere-se ao período em que ocorrem mudanças metabólicas para preparar a célula para divisão. Os eventos que ocorrem em G1 incluem o crescimento do tamanho da célula, bem como a síntese de mRNAs e proteínas. O início da fase G1 requer estimulação por fatores de crescimento e um fornecimento contínuo desses fatores de crescimento<sup>7</sup>.

A síntese de DNA ocorre na fase S, gerando exatamente dois cromossomos irmãos idênticos. Ou seja, uma célula somática diplóide normal com um complemento de 2N de DNA no início da fase S adquire um complemento 4N de DNA ao final da fase S<sup>8</sup>.

A fase G2 é um período de rápido crescimento celular e síntese de proteínas, durante o qual as células se preparam para a mitose. Portanto, G2 é o período entre as fases S e M quando as células terminaram de replicar seu DNA, estão se preparando para dividir, e têm um conteúdo de DNA 4N.

Mitose é o processo durante o qual a cromátide irmã eucariótica é separada para gerar dois núcleos<sup>9</sup>. A divisão celular é completada pela citocinese, que

segrega os núcleos, citoplasma, organelas e membrana celular em duas células filhas geneticamente idênticas<sup>10</sup>.





A divisão celular em mamíferos ocorre em quatro fases. O ciclo celular consiste em fases distintas (G1-S-G2-M), que normalmente são irreversíveis. O material genético da célula é replicado na fase S, a célula duplica sua massa na fase G2 e a divisão ocorre na fase M.

#### 1.2. Replicação DNA

A duplicação do DNA ocorre na fase S do ciclo celular garantindo que cada célula filha receba o mesmo material genético da célula-mãe. Para tanto, este deve ser um processo altamente controlado envolvendo uma grande quantidade de fatores enzimáticos e regulatórios. O processo de replicação, como dito, pode ser didaticamente dividido em três fases. Iniciação, elongação e reparo. O processo inicia-se ainda na fase G1 do ciclo celular, quando um composto protéico, denominado complexo de pré-replicação (CPR), é montado em uma região do DNA denominada origem de replicação. Quando a célula entra na fase S, a maquinaria de replicação é recrutada a estas origens e a replicação é então de fato estabelecida <sup>11; 12</sup>.

Enquanto organismos procariontes apresentam uma única origem de replicação de onde um par de forquilhas emerge em direções opostas para replicar todo o genoma, eucariontes apresentam várias origens por cromossomo. Este alto número de origens deve-se a pelo menos duas razões: (i) garantir a duplicação de todo o genoma no período estabelecido para fase S e (ii) favorecer a estabilidade do genoma. Em leveduras e metazoários, estas várias origens não são disparadas todas ao mesmo tempo no início da fase S, mas disparam separadamente no início da fase S (origens *early*) ou na metade de S (origens *late*) <sup>13; 14</sup>.

#### 1.3. Complexo de Pré-Replicação

Em Saccharomyces cerevisiae, as origens de replicação do DNA foram primeiro definidas pela sua capacidade de conferir replicação autônoma à plasmídeos<sup>15</sup>. Esses elementos foram chamados de ARSs, que continham sequências consensuais autônomas (ACs) de 11 pb, ampliadas para 17 pb<sup>15</sup>. E embora muitos outros fatores de ligação a ARS tenham sido identificados anteriormente<sup>16; 17</sup>, o complexo ORC provou ser capaz de ligar-se à ACSs<sup>18</sup>, e mutantes sensíveis à temperatura exibiram parada do ciclo celular em um estágio consistente com um papel nos aspectos iniciais da replicação do DNA<sup>19</sup>. Após a descoberta de ORC em levedura, o complexo ORC foi identificado em S. pombe<sup>20</sup>, D. melanogaster<sup>21</sup>, X. laevis<sup>22</sup> e seres humanos. O mecanismo da função da ORC tem sido investigado em vários modelos celulares, revelando que os componentes centrais, a organização das subunidades e a função das ORC são amplamente conservados. O complexo ORC é formado por seis subunidades (Orc1-6) e é organizado em forma de C, com a fita do DNA sendo inserido na fenda central, permitindo a interação proteína-DNA (Lee e Bell 1997; Speck et al. 2005; Sun et al. 2012; Yuan et al. 2017).

A montagem do complexo pré-replicação (Figura 1.3) ocorre apenas durante o final da fase M e início de G1. Portanto, depois que ORC se liga à origem da replicação, é recrutado a proteína Cdc6. O complexo ORC / Cdc6 contém quatro proteínas de ligação ao ATP: Cdc6, Orc1, Orc4 e Orc5. A ligação de ATP por Orc1 e Cdc6 é necessária para a formação do complexo ORC/Cdc6/DNA (Weinreich et al. 1999; Gillespie et al. 2001; Klemm e Bell 2001; Pontinho et al. 2005; Randell et al. 2006; Speck e Stillman 2007). A formação do complexo ORC/Cdc6 é essencial para o recrutamento do Cdt1 e para o carregamento de MCM2–7 ao DNA dupla fita, sendo MCM2–7 o núcleo de helicase replicativa do DNA. Portanto, quando MCM2-7 é carregado, a origem encontra-se licenciada para iniciar a replicação. Durante o carregamento de MCM2-7, Cdt1 é liberada do DNA de maneira ATP-dependente <sup>23</sup> propiciando que o hexâmero de MCM2-7 envolva a dupla fita de DNA.

Figura 1.3 Montagem do complexo de pré replicação



Nos eucariotos modelo, da mitose tardia ao final da fase G1, ORC (Orc1-6) é recrutada para origens de replicação no genoma. ORC interage com Cdc6 e Cdt1. Em seguida, é recrutada a helicase MCM (Mcm2-7) e o *carregamento* na origem é mediado por Cdt1. Isso forma o pré-RC e torna as origens da replicação "licenciadas".

As subunidades do complexo de manutenção de minicromossomos (MCM) foram inicialmente identificados como genes que possuem papel essencial na manutenção do DNA extracromossomal em *Saccharomyces cerevisiae*. Em células eucarióticas, MCM (Mcm2-7) forma um complexo heterohexamerico que funciona como uma DNA helicase que participa do desenovelamento da dupla fita de DNA durante o processo de replicação do DNA.

Estudos envolvendo a estabilidade bioquímica do complexo MCM sugeriram que Mcm-2, 4 6 e 7 recém-sintetizados formam um complexo heterotetramérico que se transloca para o núcleo, enquanto Mcm-3 e 5 formam outro complexo que também se transloca para o núcleo. Estes dois complexos são montados e formam o complexo heterohexamérico Mcm2-7 na origem de replicação do DNA<sup>24</sup>, como descrito acima.

A interação de CDC45, MCM2-7 e GINS formam o complexo CMG. Nesse processo, CDC45 interage com Mcm-2 e o complexo GINS interage com Mcm-3 e Mcm-5. E diversos estudos vêm evidenciando que complexo CMG exibe atividade de helicase associada a replicação do DNA.

Portanto, o complexo MCM possui o seu mecanismo principal associado a atividade de helicase capaz de desenovelar o DNA dupla fita e, assim, ajudar eficientemente a iniciar a replicação do DNA. Mas há algumas questões importantes que envolvem o papel do MCM. Até o momento, não há informação genômica sobre os locais de ligação da MCM em células de mamíferos, mas dois fatos paradoxais foram amplamente divulgados. Primeiro, eles são carregados em excesso (5 a 20 vezes) em relação ao número real de origens de replicação na maioria dos sistemas, incluindo levedura, *Xenopus* e células de mamíferos se ligam à cromatina não replicada e são aparentemente excluídas dos focos de replicação ativos<sup>26; 27</sup>. A combinação desses dois fatos é comumente referida como o "paradoxo MCM". Nos últimos anos, a necessidade de um excesso de MCM foi explicada pela descoberta de origens silenciosas de replicação que são usadas apenas em situações de estresse<sup>27</sup>.

#### 1.4. Complexo de replicação

Durante a transição G1/S no ciclo celular, duas proteínas kinases (CDK e DDK) fosforilam o complexo MCM. Uma vez fosforilado, o complexo MCM permite a conversão do CPR em um complexo de forquilha de replicação, denominado replissomo, através do recrutamento de Cdc45 e do complexo GINS (composto pelas proteínas Sld5-Psf1-Psf2-Psf3) <sup>28</sup>. O complexo formado por Cdc45/MCM/GINS (complexo CMG), é uma helicase capaz de desfazer a dupla fita de DNA <sup>28; 29</sup>. Uma vez aberta a dupla fita de DNA, DNA polimerase α (Pol α)-primase, DNA polimerase δ (Pol δ), e DNA polimerase ε (Pol ε) passam a ter acesso a ambas as fitas. A Pol α-primase, interage com homotrimérico Ctf4, que por sua vez se associa ao Complexo GINS, e então Pol α-primase sintetiza os *primers* de RNA necessários para a processividade de Pol δ and Pol ε nas fitas *lagging* e *leading*, respectivamente. Estas polimerases, no entanto, dependem da molécula de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen - PCNA), que circula o DNA favorecendo a interação das polimerases com o DNA. Participam ainda da replicação o fator de replicação C, que circula a molécula de PCNA envolta do

DNA; RPA (replication protein A), que estabiliza a simples fita de DNA enquanto a dupla fita está aberta; topoisomerase, que sege na frente da forquilha desenovelando o DNA; e FEN-1 e DNA ligase I, que processam e selam os fragmentos de Okazaki <sup>30; 31</sup>.



Figura **1.**4. Esquema da forquilha de replicação eucariótica e polimerases replicativas.

O heterohexâmero MCM2–7 circunda a fita *leading* e desenovela a dupla fita usando hidrólise de ATP. O priming das cadeias *leading* e *lagging* é realizado pela Polα-primase que está ancorada com o complexo CMG via Ctf4. Os primers são estendidos por Polõ na fita *lagging*. Polε é recrutado para a cadeia *leading* através de interações com o complexo CMG. Há evidências de polε ou polõ como polimerase de fita *leading*. Fatores acessórios, como PCNA e RPA, são recrutados. Retirado de Jain e Colaboradores<sup>32</sup>.

#### 1.5. Helicases

As helicases são enzimas envolvidas em diversos aspectos do metabolismo dos ácidos núcleicos (RNA e/ou DNA)<sup>33</sup>. As helicases utilizam a energia derivada da hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) para se translocar ao longo da fibra de ácido nucléico e romper as muitas ligações de hidrogênio entre as cadeias complementares do ácido nucléicos de fita dupla. Além disso, certas DNA helicases desenrolam estruturas como triplexes ou G-quadruplexes e/ou deslocam proteínas ligadas ao DNA de fita simples ou dupla. As helicases de DNA desempenham papéis na replicação do DNA celular, transcrição, reparo de

DNA e outros processos para preservar a integridade do genoma e manter a homeostase celular<sup>34</sup>.

As diferentes helicases exibem um certo grau de homologia na sequência de aminoácidos, conferindo a elas funções comuns. Todas helicases possuem motivos localizados no interior da sua estrutura primária, envolvidos na ligação de ATP, hidrólise de ATP e translocação ao longo do substrato de ácido nucléico. A porção variável da sequência de aminoácidos está relacionada com as características específicas de cada helicase.

As helicases são amplamente categorizadas dentro da superfamília (SF 1-6) (Tabela 1.1), a qual elas pertencem, e são categorizadas com base na homologia da sequência de determinados motivos conservados, e na homologia de domínios auxiliares residentes nas regiões N ou C-terminal da proteína<sup>35</sup>. Além disso, as helicases também são classificadas como  $\alpha$  ou  $\beta$ , dependendo se trabalham com o ácido nucléico de cadeia simples ou dupla, respectivamente. Por fim, são também classificadas de acordo com o seu movimento em relação à cadeia de ácido nucléico à qual estão associadas. Como as fitas de uma dupla hélice são orientadas em uma configuração anti-paralela, tal movimento poderia ocorrer na direção 5'-3 ' ou na direção 3'-5'. A polaridade, portanto, é verificada através da identificação da região da fita dúplex que é desnaturada pela helicase. Ou seja, para helicases envolvidas na replicação do DNA, a polaridade da reação é uma forte indicação do sentido da ação da helicase, podendo ser 3' - 5' (leading) ou 5' - 3' (lagging). A direção do movimento da helicase pode ser facilmente verificada analisando a capacidade de uma helicase de desenovelar substratos dúplex possuindo caudas de ssDNA (ou ssRNA), uma vez que a extensão da ssDNA é utilizada para o contato inicial. Em resumo, as helicases 5'-3 'apenas desenovelam substratos com uma cauda 5', enquanto as helicases 3 '- 5' precisam de uma cauda 3' para iniciar o desenovelamento.

# Tabela Erro! Nenhum texto com o estilo especificado foi encontrado no documento.1 Superfamília de helicases, principais características e representantes.

Superfamília	Características	Representantes
SF1	Subdividida em helicases SF1A e	SF1A: Rep,UvrD e
	SF1B. Polaridade de translocação de	PcrA
	3'-5' (subfamília SF1A) ou 5'-3'	SF1B: RecD e Dda
	(subfamília SF1B)	
SF2	Presença de nove motivos	RNA helicases,
	conservados Q, I, Ia, Ib e II à VI. A	RecQ-like e Snf2-
	maioria das helicases possuem	like
	translocação 3'-5'	
SF3	Codificadas principalmente por vírus.	Helicase E1 do
	Possuem uma direcionalidade de	papiloma vírus
	translocação de 3'-5 '	
SF4	Possuem direcionalidade de	gp4 do bacteriófago
	translocação de 5'-3'	Τ7
SF5		Proteínas Rho
SF6	Eles contêm o núcleo AAA + que não	MCM, RuvB, RuvA
	está incluído na classificação SF3	e RuvC

#### 1.5.1. Superfamília II de Helicases

A SF2 é a maior e mais diversificada das superfamílias das helicases e seus membros estão envolvidos na transcrição, no reparo do DNA e no rearranjo da cromatina e em todos os aspectos do metabolismo do RNA. A SF2 está dividida em famílias, incluindo RecQ-like, RecG-like, Rad3/XPD, Ski2-like, enzima de restrição tipo I, RIG-I-like, NS3/NPH-II, DEAH/RHA, DEAD-box e Famílias Swi/Snf com base na homologia de sequências. Esta subfamília inclui também grupos menores, como as enzimas de restrição do tipo III e Suv3. Apesar de serem classificadas como helicases, alguns membros não mostraram a capacidade de separar a dupla fita de ácidos nucleícos ou translocar sobre ácidos nucléicos. Alguns desenovelam o DNA ou RNA enquanto translocam ao longo do ácido nucléico, alguns desenovelam sem translocação e alguns translocam sem desenovelamento. No entanto, todos os membros possuem

atividade ATPásica estimulada pela interação com ácidos nucléicos. (Tabela 1.2).

	D	NA	RNA	
Família	Simples	Dupla fita	Simples	Dupla fita
	fita		fita	
DEAD-box				Desenovelar
DEAH/RHA			Translocar	Desenovelar
RecQ-like	Translocar	Desenovelar		
Rad3/XPD	Translocar	Desenovelar		
Swi/Snf		Translocar		Translocar
RIG-I-like		Translocar		
Enzima de Restrição		Translocar		
Tipol				
Ski2-like			Translocar	Desenovelar
RecG-like		Translocar		
NS3/NPH-II			Translocar	Desenovelar

Tabela 1.2. Subdivisões da SF2 de helicases

#### 1.6. DNA polimerases

Atualmente existem 15 tipos de DNA polimerases de mamíferos conhecidas. DNA polimerases desempenham papéis centrais não apenas na replicação do DNA (pols  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ), mas também no reparo de excisão de bases (pol  $\beta$ ), replicação e reparo mitocondrial (pol  $\gamma$ ), end-joining não homólogo e diversidade imunológica (pols  $\lambda$ ,  $\mu$  e terminal-desoxinucleotidil transferase), e tolerância ao dano ao DNA ( $\eta$ ,  $\kappa$ , Rev, Rev1). Algumas polimerases de DNA têm papéis em mais de uma via de processamento de DNA.

As DNA polimerases de replicação evoluíram para garantir a manutenção e replicação fiel do genoma, garantindo a transmissão precisa da informação genética. A maioria das DNA polimerases podem ser classificadas nas famílias A, B, C e Y de acordo com a similaridade da sequência de aminoácidos com as DNA polimerases de *Escherichia coli* I, II, III e IV/V<sup>36</sup> (Tabela 1.3). As DNA

polimerases eucarióticas  $\beta$ ,  $\lambda$ ,  $\mu$  e terminal transferase compreendem a família  $X^{37}$ .

Família	Tipo de polimerase	Representantes
A	Replicativa e reparo	T7 DNA polimerase, Pol I, e DNA Polimerase γ
В	Replicativa e reparo	Pol II, Pol Β, Pol ζ, Pol α, δ, e ε
С	Replicativa	Pol III
D	Replicativa	
X	Replicativa e reparo	Pol $\beta$ , Pol $\sigma$ , Pol $\lambda$ , Pol $\mu$ , e Terminal deoxynucleotidyl transferase
Y	Replicativa e reparo	Pol ι, Pol κ, Pol η, Pol IV e Pol V
RT	Replicativa e reparo	Telomerase

Tabela 1.3. A divisão das famílias de DNA polimerases.

#### 1.7. DNA polimerase $\theta$

Dentre as DNA polimerases de replicação encontra-se a DNA polimerase θ (Polθ). Esta proteína apresenta um domínio C-terminal de DNA polimerase, um domínio N-terminal que apresenta motivos típicos de helicases SF2, e um domínio central menos conservado de função desconhecida. A Polθ é uma das três polimerases da família A de DNA polimerases de células humanas, mas, excepcionalmente dentro desta família, exibe uma baixa fidelidade de síntese no DNA normal e pode contornar as lesões oxidativas de timina glicol, que são os principais produtos de dano ao DNA induzido por espécies reativas de oxigênio<sup>38</sup>.

Em mamíferos, a proteína Pol  $\theta$  é codificada pelo gene POLQ, e na mosca da fruta *Drosophila melanogaster* codificada pelo gene Mus308. Genes com semelhança com POLQ e Mus308 estão presentes em planarias, protistas e eucariotos multicelulares, mas não em leveduras ou outros fungos. Resta determinar se os genes do tipo POLQ são verdadeiros ortólogos a estes encontrados em outros organismos, pois uma característica notória nesses genes são as aparentes diferenças funcionais entre as espécies<sup>39; 40</sup>.

Dois outros genes em eucariotos multicelulares, nomeados HELQ e POLN, mostram relações significativas e intrigantes com POLQ. HELQ é um gene que codifica uma helicase de reparo de DNA com similaridade de sequência de aminoácidos ao domínio do tipo helicase de Polθ. Homólogos de HELQ são encontrados em animais e archaea, mas não em fungos ou bactérias<sup>41</sup>. Por sua vez, o gene POLN codifica uma proteína de 900 aminoácidos em células humanas, abrigando um domínio de DNA polimerase da família A relacionado ao domínio polimerase de Polθ. Em contraste com POLQ, a distribuição filogenética do POLN parece estar limitada à linhagem de deuterostomo de eucariotos, incluindo vertebrados. Além disso, curiosamente, a análise filogenética sugere que POLN e POLQ eram divergentes um do outro antes do início da linhagem dos vertebrados<sup>41; 42</sup>.

#### 1.7.1. Função celular de Polθ

Nas recentes observações sobre o papel da Pol  $\theta$  na dinâmica celular, um estudo demonstrou evidências da participação de Pol  $\theta$  durante o ciclo celular em células não estressadas, indicando que Pol  $\theta$  pode atuar na replicação normal do DNA. De um modo geral, o estudo de Fernandez-Vidal e colaborares<sup>43</sup> demonstrou que, em células humanas, o tempo de associação de Pol  $\theta$  com a cromatina parece ser semelhante ao da formação do CPR e é concomitante com o *carregamento* de MCM. Além disso, este estudo evidenciou que Pol  $\theta$  interage com Orc2 e Orc4. Os dados revelaram também que as células que apresentavam depleção de Pol  $\theta$  demonstraram aumento no *carregamento* de MCM na cromatina e mudanças no tempo de replicação do genoma, sem modificação da densidade de origem.

Além disso, estudos em *Drosophila* sugeriram que Pol θ atua no reparo de quebra de fita dupla através da síntese de DNA durante ligação de extremidades mediada por micro-homologia (MMEJ, do inglês: *microhomology-mediated end joinining*)<sup>44</sup>. Essa função potencial de reparo do DNA poderia explicar por que as células do estroma da medula óssea deficientes em Pol θ de camundongo e os tumores depletados por Pol θ de células humanas exibem maior sensibilidade à radiação ionizante<sup>45</sup>. Esse papel na defesa contra danos no DNA induzidos pela radiação ionizante também pode ser devido à capacidade da polimerase de realizar síntese translesiana (TLS) em sítios abásicos e lesões de timina glicol,. Além disso, o domínio de polimerase de Pol θ parece ser suficiente para esse

processo, mostrando a capacidade de catalisar tanto a inserção quanto as etapas de extensão necessárias para contornar a lesão do DNA<sup>46</sup>.

#### 1.7.2. Domínio Helicase de DNA polimerase $\theta$

Os trabalhos publicados até o momento sobre Pol  $\theta$  revelaram informações valiosas sobre como essa proteína funciona, entretanto, quando se observa os domínios individualmente, surgem diversas questões sobre a funcionalidade específica do domínio helicase e seu papel como uma helicase de fato.

O domínio helicase de Pol0 (Pol0-helicase) é um membro das helicases SF2, mais intimamente relacionado com a família de helicases Ski2/Hel308, que estão envolvidas no desenovelamento-ATP dependente de ácidos nucléicos de dupla fita no sentido 3'-5 ' em origens de replicação. A caracterização bioquímica de Pol0-helicase de células humanas mostrou que esta proteína possui atividade de ATPase estimulada por DNA. Entretanto, dentre todos os estudos associados à Pol0, apenas o estudo de Ozdemir e colaboradores (2018)<sup>41</sup> foi capaz de demonstrar que Pol0-helicase possui a capacidade de desenovelar o DNA e, neste estudo, foi demonstrado a capacidade desse domínio de desenovelar eficientemente o DNA com polaridade 3'-5', incluindo DNA com 3' ou 5' *overhangs*, DNA *blunt-ended* e forquilhas de replicação. Além disso, demonstrou-se que Pol0-helicase é capaz de desenovelar de forma eficiente híbridos de RNA-DNA e apresentou preferência para desenovelar a cadeia *lagging* nas forquilhas de replicação, semelhante a helicase HELQ <sup>41</sup>.

Apesar os notáveis avanços, a função Polθ-helicase, que é semelhante em sequência às helicases do tipo Hel308 e RecQ, permanece pouco elucidada. Dentre os poucos estudos envolvendo especificamente o domínio helicase de Polθ, foi proposto que Polθ-helicase de mamíferos atua em conjunto com um motivo de interação de Rad51 de forma antagonista durante a recombinação homóloga. Além disso, promove translocações cromossômicas por união de extremidade não-homóloga alternativa (alt-NHEJ) em células-tronco embrionárias de camundongos. No mesmo estudo, foi demonstrado que Polθ-helicase facilita a remoção de RPA de locais de quebra de dupla fita para permitir seu *annealing* e subsequente junção por alt-NHEJ<sup>47</sup>.

#### 1.8. Trypanosoma cruzi

O agente causador da doença de Chagas, o protozoário *Trypanosoma cruzi* (Eucarya, Kinetoplastea, Trypanosomatidae), é um parasita geneticamente diverso, capaz de infectar uma ampla gama de vertebrados, incluindo mais de 100 espécies de mamíferos<sup>2; 5</sup>.

#### 1.8.1. Ciclo de vida

O T. cruzi possui um ciclo de vida complexo com dois hospedeiros, um vertebrado e um inseto da família Reduviidae, apresentando formas celulares diferentes em cada hospedeiro<sup>48</sup>. No hospedeiro invertebrado, o ciclo biológico do T. cruzi inicia-se após a ingestão de sangue infectado durante o repasto sanguíneo. Ao chegar ao estômago do vetor, as formas tripomastigotas sanguíneas iniciam sua diferenciação em formas epimastigotas. Estas formas migram para o intestino onde se multiplicam. Na porção média e posterior do intestino, ocorre a diferenciação celular das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas (formas infectivas), que são liberadas nas fezes e na urina do triatomíneo<sup>49; 50</sup>. Durante o repasto sanguíneo de insetos infectados, parasitas podem ser eliminados nas fezes e podem infectar seus hospedeiros mamíferos através da pele (pequenas descontinuidades) ou pelas mucosas. Os amastigotas podem se desenvolver na grande maioria das células com exceção de alguns tipos celulares, como neutrófilos e basófilos. A entrada do parasita na célula hospedeira é um processo complexo. O tripomastigota metacíclico entra na célula de uma maneira polarizada, preferencialmente ao longo da parte basolateral da membrana, lugar das fibronectinas e receptores da célula hospedeira estão concentrados<sup>51</sup>. Logo após a entrada do parasito, forma-se o vacúolo parasitóforo e se inicia a diferenciação das formas tripomastigotas metacíclicas em amastigotas, com posterior ruptura da membrana do vacúolo. Após sucessivas divisões dos amastigotas no interior da célula, ocorre um processo de transformação dos mesmos em tripomastigotas sanguíneos. Logo que as formas adquirem um flagelo mais longo, inicia um movimento que pode ser responsável pela ruptura da membrana da célula hospedeira com a liberação de muitos tripomastigotas, e até formas amastigotas, para o espaço extracelular<sup>50</sup>. Um grande número de tripomastigotas sanguíneos é liberado na ruptura da célula. Estes parasitas podem ou não infectar outras células e tecidos, tais como sistema reticulo endotelial, sistema nervoso, músculo cardíaco, músculo esquelético ou serem ingeridos pelo inseto vetor, completando assim seu ciclo de vida<sup>49; 50</sup>.





#### 1.8.2. Ciclo celular em T. cruzi

Como dito, amastigotas e epimastigotas são as formas do *T. cruzi* que possuem a capacidade de duplicar seu material genético, enquanto tripomastigotas sanguíneos e metacíclicos não são capazes.

Para estudos envolvendo o ciclo celular, um bom modelo de trabalho é a forma epimastigota, já que, além de fácil obtenção em cultura, é possível observar, via alterações morfológicas, em qual estágio do ciclo celular o parasita se encontra. Observa-se a fase do ciclo em que o parasita se encontra pela quantidade de núcleos (N), cinetoplastos (K) e flagelos (f) por célula. Com isso, epimastigotas na fase G1/S do ciclo apresentam 1N, 1K e 1f, ao final da síntese do DNA inicia-se a formação de um novo flagelo e a célula entra em G2 apresentando 1N, 1 K, 2 f. A segregação do cinetoplasto ocorre durante a mitose

(M) e a célula apresenta 1N, 2K e 2 f, após há a segregação do núcleo durante a citocinese onde o epimastigota possui 2N, 2K e 2f<sup>52</sup> (Figura 1.6).



Figura 1.6. Representação esquemática das alterações morfológicas do ciclo celular do epimastigota.

#### 1.8.3. Replicação do DNA em Tripanosomatídeos

As pesquisas envolvendo a dinâmica da replicação em tripanosomatídeos são bastante recentes, uma vez que o sequenciamento dos genomas do TriTryp (*Trypanosoma brucei, Leishmania major e Trypanosoma cruzi*) ocorreu em 2005, o que forneceu um estímulo para o campo da biologia do cinetoplastídeo<sup>53</sup>. Portanto, antes do sequenciamento do genoma, as tentativas de examinar a dinâmica de replicação não podiam considerar todo o genoma e pouco trabalho havia examinado o mecanismo de replicação. Surpreendentemente, as pesquisas de similaridade de sequência foram incapazes de identificar várias proteínas da replicação de DNA, em particular aquelas envolvidas nas etapas de iniciação do processo: enquanto ortólogos da maioria dos fatores envolvidos na montagem da forquilha de replicação e síntese de DNA foram prontamente identificados, apenas um fator relacionado a Orc1 pôde ser encontrado. Como em outros eucariotos, essa suposta subunidade Orc1 também compartilhava

homologia com o Cdc6 (o fator essencial que interage com o ORC para permitir o carregamento da helicase replicativa nas origens de replicação). A falta de ortólogos identificáveis das outras subunidades de ORC, Cdc6 e um outro carregador de helicase (Cdt1), sugeriu que o início da replicação de DNA nesses parasitas poderia ser mecanicamente mais semelhante aos organismos de archea do que os eucariotos superiores. Em consonância com esta hipótese, e apoiado por evidências experimentais, Orc1 em *T. cruzi* e *T. brucei* foi nomeado Orc1/Cdc6<sup>54</sup>. Além de complementar Cdc6 de levedura, a Orc1/Cdc6 de *T. cruzi* (TcOrc1/Cdc6) e de *T. brucei* (TbOrc1/Cdc6) apresentavam características típicas de um componente da maquinaria de pré-replicação. Além disso, evidências experimentais mostraram que Orc1/Cdc6 é expressa durante todo o ciclo celular no núcleo da forma replicativa epimastigota, permanecendo associado à cromatina em todos os estágios do ciclo celular. No entanto, não se liga ao DNA nas formas não replicativas.

Um estudo posterior, no entanto, questionou se o iniciador cinetoplastídeo é apenas uma única proteína. Durante a análise funcional de componentes da helicase replicativa em *T. brucei* - o complexo MCM, complexo GINS e CDC45 - os autores identificaram um segundo ortólogo altamente divergente de Orc1. Rotulado como TbOrc1b, este iniciador putativo foi mostrado interagir com TbOrc1/Cdc6 e TbMcm3, mas seu papel na replicação do DNA não foi explorado<sup>55</sup>. No entanto, outras evidências de que *T. brucei* pode não ter um único fator iniciador de proteína, mas um complexo semelhante a ORC, foi fornecido por um estudo seguinte, no qual mais três fatores que interagem com TbOrc1/Cdc6 foram identificados: uma subunidade do tipo Orc4 altamente divergente (TbOrc4), e dois fatores, Tb7980 e Tb3120, com homologia muito limitada com proteínas Orc <sup>56</sup>.

Estudos mais recentes forneceram, portanto, fortes evidências de um complexo do tipo ORC, revelando que a perda de TbOrc1/Cdc6, TbOrc1b, TbOrc4 ou Tb3120 impede a replicação do DNA e leva a defeitos similares de crescimento e ciclo celular <sup>54; 56; 57</sup>. Além disso, os trabalhos na área sugeriram que TbOrc1/Cdc6 e TbOrc4 estão presentes, provavelmente juntos, em um complexo que também parece incluir a subunidade helicase TbMcm3<sup>55</sup>.

Assim, os trabalhos gerados na última década, principalmente pelo nosso grupo e pelo grupo do Dr. McCulloch, levaram a proposta da composição do CPR de Trypanosoma como esquematizado na Figura 7. A fim de aprimorar esses estudos e avançar na dissecção molecular do CPR de Trypanosoma, nós decidimos buscar e caracterizar, neste trabalho, interatores da proteína Orc1/Cdc6.

Figura 1.7. A maquinaria de pré-replicação de tripanossomatídeos



# Tripanosomatídeos

Os tripanossomatideos, apresentam um complexo do tipo ORC-like, compreendendo Orc1/Cdc6, Orc4, Tb3120 e Tb7980. Não está claro se outras subunidades ainda precisam ser identificadas. Supõe-se que o *carregamento* de MCM (Mcm2-7), assim como em outros eucariotos, ocorre antes da fase S. Nenhum ortólogo de Cdt1 foi identificado, e permanece indeterminado a presença de um ortólogo de Cdc6. Retirado e adaptado de Da Silva e colaboradores 2017<sup>58</sup>.
### 2. OBJETIVOS

## 2.1. Objetivo geral

Buscar interatores da proteína Orc1/Cdc6, e caracterizar o papel deste na replicação do parasita;

## 2.2. Objetivos específicos

i) Buscar proteínas que interajam com Orc1/Cdc6 combinando técnicas de *pull down* e espectrometria de massas;

ii) Caracterizar a funcionalidade do interator de Orc1/Cdc6 a partir de análises que envolvam o uso de proteínas recombinantes e linhagens modificadas do parasita.

### 3. MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.1. Ensaios envolvendo o uso de epimastigotas

#### 3.1.1. Cultura de Epimastigotas

As formas epimastigotas foram mantidas em meio LIT (Camargo, 1964) suplementado com 10% de soro fetal bovino à 28 °C. As células foram mantidas até antigirem a concentração de 10<sup>7</sup> células/mL, e então diluídos para 3x10<sup>6</sup> células/mL. Epimastigotas superexpressando polθhelicase foram cultivadas nas mesmas condições acima na presença de 500 µg/ml de G418 (Gibco por Life Technologies).

#### 3.1.2. Curva de crescimento

Epimastigotas em crescimento exponencial foram coletados, lavados em PBS, contados em uma câmara de Neubauer e distribuído em duplicata ( $2 \times 10^6$  células / mL) em meio LIT. O crescimento foi monitorado diariamente contando parasitas em uma câmara de Neubauer por 4 dias. Os ensaios foram realizados em três condições experimentais e biológicas independentes. Dados quantitativos foram expresso com a média ± desvio padrão, e os resultados foram analisados estatisticamente utilizando a ferramenta Teste de Student-Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando os valores de p foram <0,05.

#### 3.1.3. Ensaio de Sincronização

Para a sincronização das formas epimastigotas na fase G1/S do ciclo celular do parasita, foi utilizado o protocolo com Hidroxiuréia. Neste ensaio foi acrescido Hidroxiuréia, para uma concentração final de 20 mM, à cultura de epimastigotas à 3x10<sup>6</sup> parasitas/mL e incubados à 28 °C por 24 h. Após a incubação, os parasitas foram centrifugados (3,220 g x 10 minutos), e o pellet de parasitas foi lavado três vezes com PBS e centrifugados na mesma condição anterior. Os parasitas foram ressuspensos em meio LIT acrescido de 10% de soro fetal bovino e incubados à 28 °C. Neste ponto a cultura estava sincronizada em G1/S. Para coletar os pontos correspondentes à S, G2 e G1 as células foram coletadas após 6 h, 18 e 24 h respectivamente. As amostras coletadas foram então

utilizadas para ensaios com citometria de fluxo, e para ensaios de imunobloting a partir do extrato diferencial das amostras.

#### 3.1.4. Fracionamento celular

Epimastigotas em crescimento exponencial de *T. cruzi* (10<sup>8</sup>) foram tratados com 100 µl do tampão de extração [0.1% de Triton X-100, 100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH 7.4, 3 mM de MgCl2, 300 mM sacarose, NaF 50 mM, Na3VO4 1 mM, PMSF 0.5 mM e coquetel inibidor de protease isento de EDTA (Roche)] à 4 ° C por 10 min. As amostras foram centrifugadas (3,800 g x 2 min) e os sobrenadantes foram reservados (fração solúvel 1 - SF1). As células peletadas foram tratadas com o mesmo tampão de extração e centrifugadas (3,800 g x 2 min), e os sobrenadantes foram reservados (fração solúvel 2 - SF2). Em seguida, os pellets foram tratados com 500 unidades de DNase I (Fermentas) por 30 minutos. As amostras foram subsequentemente centrifugadas (3,800 g x 2 min) e os sobrenadantes foram também reservados (proteína de ligação ao DNA - DBP). As amostras foram separadas por SDS-PAGE e analisadas por western blot. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados para cada análise apresentada aqui.

#### 3.1.5. Análise por western blotting

Os immunoblots foram realizados usando 10<sup>7</sup> epimastigotas por poço; as amostras foram fracionadas por SDS-PAGE e transferido para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas durante 1 h com leite em pó desnatado à 5% em PBS e depois incubadas com os anticorpos anti-Polθ-helicase purificados por afinidade (diluída 1:10), anti-TcOrc1/Cdc6 (diluída 1: 1,000) (19), antiTcMcm-7 (diluído 1: 100) (26), anti-GAPDH (diluído 1: 3,000) (27) e anti-histona H3 (diluído 1: 3,000) (Abcam) overnight à 4 ° C. As membranas foram lavadas várias vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG acoplado à peroxidase (Santa Cruz) (diluído 1: 3,000) por 40 minutos, lavado várias vezes com PBS, e para a revelação foi adicionado um substrato quimioluminescente (Pierce) utilizando o protocolo padrão descrito pelo fabricante. A detecção da imagem foi realizada com um Sistema de Imagem UVitec (Cambridge). Para quantificar as bandas de western blotting, foi utilizado o software ImageJ. Três experimentos independentes foram realizados para

cada análise apresentada aqui, e os dados foram analisados usando o software Prism 5 (GraphPad). Os dados quantitativos foram expressos como a média ± desvio padrão, e os resultados foram analisados estatisticamente usando o teste T de Student-Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas estatisticamente significante quando os valores de p foram <0,05.

#### 3.1.6. Citometria de fluxo

Foram retirados  $10^7$  Epimastigotas de uma cultura em fase exponencial, estes parasitas foram centrifugados (660 x g, 5 min) e lavados com PBS e fixados em 1 mlde etanol 70% *overnight* a -20 °C. As amostras foram incubadas com iodeto de propídio (1 mg / ml) e 10 µL de RNAse (10 mg / ml) em PBS, e o conteúdo de DNA analisado pelo Citômetro Attune® Acoustic Focusing (Applied Biosystems).

#### 3.1.7. Ensaios de incorporação de EdU

Epimastigotas em crescimento exponencial foram incubados com 100 µM de EdU (Click-iT Edu Image Kit, Invitrogen) por 60 minutos. As células foram centrifugadas, lavadas com PBS e fixadas com 4% (v/v) de paraformaldeído em PBS durante 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram permeabilizadas com 0.1% de Triton X 100 durante 5 minutos e lavadas com PBS. Então, as células foram processadas usando uma reação química click, como descrito em Da Silva e colaboradores<sup>59</sup>. As lamínulas foram montadas com VECTASHIELD Antifade Mounting Medium com 4 ', 6-diamidino-2-phenylindole dicloridrato (DAPI). A análise do número de células que incorporaram o EdU foi realizada monitorando 200 células totais por lamínula em três experimentos, em duplicata, utilizando um microscópio BX51 (Olympus). A intensidade do EdU foi monitorada pela quantificação da intensidade de fluorescência utilizando como ferramenta o software ImageJ. Três experimentos independentes foram realizados e os dados foram analisados utilizando o software Prism 5 (GraphPad). Os dados quantitativos são expressos como média ± desvio padrão, e os resultados foram estatisticamente analisados utilizando a ferramenta Teste T de Student Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando os valores foram p < 0.05.

#### 3.1.8. Imunofluorescência

Epimastigotas em crescimento exponencial expressando Polθ-helicase-GFP foram fixados em 4% de paraformaldeído (Merck, Alemanha) em PBS durante 20 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram permeabilizadas com Triton X-100 a 0.1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e bloqueadas em uma solução de albumina de soro bovino a 3% (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)por 30 minutos e incubada com mAbAC<sup>54</sup> (anticorpo específico para flagelo do *T. cruzi*), em 1% de BSA em PBS por 1 h. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 555 (diluído 1: 300) (Thermo Scientific). As lâminas foram montadas com VECTASHIELD Antifade Mounting Medium com 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Vectorlab) e analisados sob um microscópio BX51 (Olympus).

#### 3.1.9. DNA combing

#### a) Incorporação dos análogos de timidina

 $10^8$  Epimastigotas em crescimento exponencial (5 x  $10^6$ /ml) foram incorporados com dois análogos de timidina, 5-iodo-2-desoxiuridina (IdU-Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e 5-cloro-2 desoxiuridina (CldU-Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Os parasitas foram incubados com 100 µM de IdU por 20 minutos e depois incubados com 100 µM CldU durante mais 20 minutos.

#### b) Preparação dos plugs de agarose

Imediatamente após a incorporação, as células foram centrifugadas (1,250 g durante 5 minutos à 4 °C), lavadas com PBS frio e ressuspensas em 100 µl de uma solução contendo 1% de agarose *low melting* em PBS. Após homogeneização, a solução contendo os parasitas em agarose foi colocada em formas de plugs e foram deixadas para solidificar sobre o gelo por 20 minutos. Os plugs foram lavados durante dois dias à 50°C com 300 µl de solução de ESP (0.5 M EDTA, 1% de sal de sódio de N-lauroilsarcosina e 1000 µg de proteinase K), derretidos durante 20 minutos à 68 ° C em 0.5 M de Ácido  $\beta$ -(N-Morfolino) etanosulfônico (MES) (pH 5,5) e incubado durante a noite com 2 unidades  $\beta$ -agarase (Thermo) à 42°C.

#### c) Preparação das lamínulas com o DNA esticado

Uma vez derretidos os plugs, a solução contendo o DNA foi transferida para um reservatório apropriado e adicionado a este 1 mL de 0,5 M MÊS pH5.5. Moléculas de DNA foram esticadas em lamínulas silanizadas (Genomic Vision) utilizando uma máquina de DNA combing (Genomic vision). O DNA esticado foi fixado à 65°C durante pelo menos 2 h e desnaturado em NaOH a 0.5 M e NaCI a 1 M durante 8 minutos. Após a desnaturação, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS, e então desidratadas em soluções de 70 %, 90 % e 100 % de etanol.

#### d) Imunodetecção

As lamínulas com o DNA esticado foram então preparadas para o processo de imunodetecção. Primeiramente, as lamínulas foram incubadas por 30 minutos à 37 °C em solução de bloqueio (1 % de BSA, 0.1 % Triton X 100 em PBS). Foram então incubadas com a primeira solução de anticorpos contendo 4 µL de anticorpo contra camundongo anti-BrdU que reconhece IdU (Abcam)<sup>60</sup>, 2 µL de anticorpo contra rato anti-BrdU que reconhece CldU (Abcam)<sup>61</sup> e quantidade suficiente de solução de bloqueio para completar 25 µL de solução. As lamínulas foram incubadas por 1 h à 37°C, lavadas 3 vezes com PBS-Tween 0.05 % por 3 minutos e incubadas na segunda solução de anticorpos. A segunda bateria de incubação foi realizada com os anticorpos secundários anti-camundongo conjugado à Alexa 568 (Molecular Probes) e anti-rato conjugado à Alexa 488 (Molecular Probes) em solução de bloqueio. A incubação foi realizada 45 minutos à 37°C, e em seguida, lavadas com PBS-Tween 0.05%. A terceira solução de anticorpos foi preparada com o anticorpo primário anti-ssDNA em solução de bloqueio, as lamínulas foram novamente incubadas à 37°C por 2 horas, lavadas como descrito anteriormente e então incubadas com o anticorpo secundário anticamundongo conjugado à Alexa 350 (Molecular Probes) em solução de bloqueio por 45 minutos à 37°C. Após serem lavadas, as lamínulas foram montadas com Prolong Gold Antifade (Molecular Probes). A aquisição das imagens foi realizada utilizando um microscópio BX51 (Olympus).

- 3.2. Obtenção de linhagens geneticamente modificadas
- 3.2.1. Obtenção de linhagens superexpressoras utilizando o sistema Gateway®
  - a) Desenho dos oligonucleotídeos para amplificação do gene e regiões de interesse

Os primers utilizados na clonagem pelo sistema Gateway® (Tabela 4) foram desenhados contendo os sítios attB1 e attB2 (em negrito), os quais são necessários para a recombinação do fragmento ao vetor pDONR™221. Outros oligonucleotídeos foram desenhados sem códon de parada, permitindo uma posterior fusão de sequências codificadoras para etiquetas na porção carboxiterminal.

Primer	Sequência
DNApolQ_attB1	<b>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC</b> ATG
Foward	CGGAAGACGTTCGTGTGC
DNApolQ_attB2	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC</b> TGGGTCTGA
Reverse	AGCGGTGATGCCCGTG
DNApolQ_attB2	GGAAGCGGTGATGCCCGTG
Com stop codon	

Tabela 3.1, Sequência dos primers utilizados na clonagem pelo sistema Gateway®x

#### b) Obtenção dos fragmentos

A reação de recombinação entre os fragmentos purificados e o vetor de entrada da plataforma Gateway® pDONR™221 é mediada pelo complexo BPClonase™, de acordo com o manual do fabricante (Invitrogen). Para a recombinação foram utilizados 150 ng do gene de interesse, 150 ng do vetor pDONR™221, enzima e tampão TE. A reação foi incubada a 25 °C por 18 horas e interrompida com 1 µL de proteinase K por 10 minutos a 37 °C. A recombinação ocorre entre os fragmentos flanqueados por sítios attB e as regiões attP do vetor

de entrada pDONR™221 (Figura 3.1). Para a seleção das colônias bacterianas, o vetor pDONR™221 oferece resistência ao antibiótico canamicina.



Figura 3.1. Clonagem de POL0-helicase no vetor pDONR 221Plataforma GATEWAY

Clonagem de Pol0-helicase no vetor pDONR 221Plataforma GATEWAY (reação BP CLONASE) para gerar o vetor de entrada pDONR 221\_Pol0-helicase com tag no N-terminal (A) e C-terminal (B).

#### c) Recombinação nos vetores de destino pTcGW

A reação de recombinação entre o vetor de entrada contendo o gene de interesse e os vetores de destino, mediada pela enzima LR clonase™ (Figura 3.2), foi realizada utilizando-se 100ng do vetor pDONR™221-Polθ-helicase, segundo o manual do fabricante (Invitrogen - Catalog nos. 12535-019). As reações foram incubadas a 25°C por 18 horas e interrompidas com 1 μL de proteinase K por 10 minutos a 37 °C.



Figura 3.2. Recombinação do vetor de entrada pDONR 221\_Pol0-helicase com os vetores de destino

Recombinação do vetor de entrada pDONR 221\_Polθ-helicase com os vetores de destino (pTcGW(tag)\_amino)(A) e (pTcGW(tag)\_carboxi) (B) para expressão ectópica em *Trypanosoma cruzi* (reação LR CLONASE).

O vetor pTcGW é um vetor epissomal que foi utilizado para transfecção em *T. cruzi*. É baseado nos sítios de recombinação da plataforma Gateway™. Após a recombinação dos fragmentos no vetor de entrada pDONR™221 e minipreparação dos plasmídeos, foi feita a reação de recombinação entre 100 ng do vetor pDONR™221 e o vetor pTcGW. Foi feita a minipreparação dos plasmídeos através do protocolo Qiaprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) e confirmação por eletroforese em gel de agarose 1%. Após a confirmação, foi realizada a transfecção em epimastigotas.

#### d) Transfecção dos parasitas

A transfecção foi realizada com os vetores pTcGW\_Pol0helicase\_Cterm e pTcGW\_Pol0helicase\_Nterm em epimastigotas. Em cada transfecção foram utilizados um total de 5 x 10<sup>7</sup> parasitas em fase logarítimica de crescimento, e entre 10-20 µg de cada vetor em triplicata. Os parasitas foram centrifugados a 4.000 x *g* por 10 minutos, a 4 °C, lavados em 1 mL de PBS e ressuspendidos em tampão de eletroporação pH 7,5. A suspensão foi incubada em gelo, juntamente com o vetor, por 10 minutos. Para a eletroporação, as células receberam dois pulsos de 500 µF e 450 V, sendo incubadas por 10 minutos em gelo. Foram adicionados 10 mL de meio LIT em garrafa de cultura com as células. Após incubação por cerca de 24 horas a 28°C, foi adicionado 250 µg/mL de Geneticina (G418 Sigma). Após 48h a concentração foi aumentada para 500 µg/mL e após crescimento as culturas diluídas 1:4, em 10 mL de meio LIT, para seleção e clonagem das colônias.

#### 3.2.2. Obtenção de linhagens utilizando a técnica de CRISPR

Para *Knockout* (KO) e deleção de domínios, foram utilizados epimastigotas de *T. cruzi* CL Brener expressando Cas9 e T7 RNA polimerase; Cas9 foi usada para gerar a quebra de dupla fita loco-dirigido, e a T7 RNA polimerase foi utilizada para a transcrição *in vivo* do *single guide* RNA (sgRNA).

#### a) Knockout

O KO foi realizado como descrito em Beneke e colaboradores (2017)<sup>62</sup>, com algumas modificações. Para a transcrição do sgRNA in vivo, foram utilizados produtos de PCR contendo a sequência do promotor T7. Dois diferentes sgRNAs foram projetados para a região 5 'não traduzida (UTR) (primer *forward*: 5' GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG gtg ttt ccc ato gt cct ctg **GAT TTA GTTA GAA ATA GC** 3 ') e 3'UTR (primer *forward*: 5'GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG agg tgc cca gca a ctg ct**G TTT TAG AGC TAG AAA TAG C** 3') de TcCLB.509769,70. Primers *fowards* para o 5 'e 3 'UTRs eram compostos por

uma sequência promotora T7 (letras maiúsculas iniciais), uma sequência de 20 pb para clivagem dirigida ao locus Cas9 (letras minúsculas) e uma região complementar de 20 pb entre estes primers e os primers reversos (letra maiúscula em negrito). Cada PCR de sgRNA foi amplificado usando o primer forward já mencionado e o mesmo primer reverso (5'AAA AGC ACC GAC TCG GTG CCA CTT TTT CAA GTT GTT AAC GGA CTA GCC TTA TTT TAA CTT GCT ATT TCT AGC TCT AAA AC 3'), (as letras em negrito descrevem as sequências entre primers forward e reverse). Para o DNA doador foi utilizado um produto de PCR que continha gene de resistência a puromicina que substituiu o TcPolTetha após recombinação homóloga. Esse gene de resistência foi amplificado a partir do plasmídeo pTpuro\_v1 (sequência disponível em http://www.leishgedit.net/Home.html) usando os seguintes primers: forward: 5 'gtg tgt gtt tgt aat atc taa ttt ttt GTA TAA TGC AGA CCT GCT GC 3 'e reverso: 5' ttt taa ttg agc gca tcg act gca ag aac CCA ATT TGA GAG ACC TGT GC 3' (onde letras maiúsculas são complementares às sequências do plasmídeo, e letras minúsculas são os 30 pb usados para recombinação).

Um total de 10<sup>8</sup> epimastigotas foram lavados e ressuspensos em 0,35 mL de tampão de transfecção (fosfato de sódio 90 mM, cloreto de potássio 5 mM, cálcio 0,15 mM cloreto, HEPES 50 mM, pH 7,2), que foi colocado em cuvetes de 0,2 cm (Bio-rad) com 50 µL de TE contendo 10 µg de DNA doador e 5 µg de cada produto de PCR do sgRNA. Os parasitas foram eletroporados usando um Bio-Rad *gene pulser* com dois pulsos consecutivos de 500/450 V cada. Os parasitas foram colocados em 5 mL de LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidos a 28°C *overnight*; após 18 h, as drogas seletivas foram então adicionadas.

#### b) Deleção de domínio

Para exclusão do domínio de helicase, sgRNA foi amplificado por PCR utilizando o *primer foward* 5 'GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG gta tcc ctt ggc tgt gag acg GTT GAT TTA CTA GAA ATA GC 3 'e o primer reverso 5' AAA AGC ACC GAC TCG GTG CCA CTT TTT CAA GTT GAT AAC GGA CTA GCC TTA TTT TAA CTT GCT ATT TCT AGC TCT AAA CA 3 '. O DNA doador usado para recombinação homóloga foi um produto de PCR de 120 pb que foi

amplificado a partir de *foward* (5 'gcg ggt ctt ggt aca ccg cct ttt gtt ttt tcc cg ccg ttg tta gag ga gaa caa ttt ttg aat cga cgc ggc em 3 ') e *reverse* (5 'ccg cat gag aac ttc atg ctg cca cgg ata cag ttt gat gcc gcg tcg att caa aaa 3') com uma região complementar de 20 pb (letras em negrito). O primer forward consistia em 40 pb correspondentes à região 5 'a *downstream* do domínio a ser excluído mais 20 pb que foram complementares ao *primer reverse*. O *primer reverso* foi composto por 60 pb correspondente à região 3 ' upstream do domínio excluído. Após a clivagem por Cas9 Gene TcPolθ (dentro do domínio helicase C-terminal), o produto de recombinação obtido, utilizando o produto de PCR de 120 pb, resultou numa nova sequência do gene TcPolθ, sem o domínio da helicase C-terminal. Após a transfecção, como descrito acima, os parasitas foram colocados em 5 mL de LIT suplementado com 10% de SFB por 24 h a 28°C. Obtenção de proteínas recombinantes

#### 3.3. Obtenção de proteínas recombinantes

#### 3.3.1. Extração DNA genômico

Para a extração do DNA genômico dos epimastigotas, foi utilizado 10<sup>8</sup> parasitas. A cultura em crescimento exponencial foi centrifugada à 3,220g x 10 minutos e lavada com PBS e novamente centrifugada. Para lisar as células, o pellet resultante foi ressuspenso em 150 µl de meio TELT (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 62.5 mM EDTA, 2.5 M LiCl2, 4 % Triton) e homogeneizado por 5 minutos no gelo. Uma vez obtido o lisado, foi adicionado à solução mesmo volume de fenol equilibrado com 0.1 M de tris HCl pH 8.0. A amostra foi centrifugada à 20,000g x 10 minutos, e a fase superior aquosa foi coletada e transferida para um tubo novo. A esta fase aquosa foi adicionado 150 µl de clorofórmio, e após homogeneização foi centrifugado à 20,000 g x 10 minutos. A fração aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo, onde foram adicionados o dobro de volume de etanol absoluto gelado para a precipitação do DNA. Após centrifugar à 20,000 g x 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, o pellet foi lavado com 500 µl de Etanol à 70 % e centrifugado à 20,000 g x 10 minutos. O etanol foi retirado delicadamente e amostra foi seca em temperatura ambiente para evaporação de vestígios de etanol. Uma vez seco, o pellet de DNA foi ressuspenso em 100 µl de TE (10 mM Tris-HCl, e 1 mM EDTA pH 8.0) contendo 20 µg/mL de RNAse A. A amostra foi incubada à 37 ° C por 30 minutos, e então quantificada utilizando NanoVue (GE-Healthcare). O DNA genômico resultante desse ensaio foi utilizado para ensaios de PCR.

#### 3.3.2. PCR

Para amplificação dos fragmentos por PCR foram utilizados para cada reação 100 ng de DNA genômico, 2.5 mM de cloreto de magnésio, tampão contendo sulfato de amônia (Kit Platinum Taq DNA polimerase – Invitrogen), 10 pmol de cada primer, 0.4 mM de dNTPs e 2 U da enzima Taq DNA polimerase (Kit Platinum Taq DNA polimerase – Invitrogen).

O programa utilizado para a amplificação do fragmento consistia em 95°C por 3 minutos para a ativação da enzima Taq polimerase, e depois 35 ciclos de 95°C por 45 segundos para a separação da dupla fita de DNA, 60°C por 45 segundos para o *annealing* dos primers, e 72°C por 1:30 minutos para a síntese da sequência de nucleotídeos. Ao final dos 35 ciclos, 72°C por 10 minutos e mantidas em 4°C até o momento de uso.

Tabela 3.2. Sequência dos prin	ners utilizados p	bara amplificar	o gene de l	-0lo
	helicase			

Primer	Sequência
Polθhel_Foward	GCAGCAAAAAACTGGCTCCGTGGGCGC
Pol0hel_Reverse	GCGCCCACGGAGCCAGTTTTTGCTGC

#### 3.3.3. PCR de colônia

Colônias de bactérias cultivadas em placas com meio LB-ágar foram coletadas e adicionadas em 25 µl de LB líquido, em seguida 2 µl foram adicionados à reação de PCR (descrita anteriormente). O programa pra amplificação do fragmento foi o mesmo descrito anteriormente.

#### 3.3.4. Clonagem pGEM-T

Os fragmentos amplificados nas reações de PCR foram separados em gel de agarose à 1% em TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA pH 8.0) à 120 V. O fragmento na altura correspondente as cópias desejadas foram recuperadas do gel de agarose e clonado no vetor pGEM-T (Thermo scientific) conforme instruções do fabricante. Em seguida, a construção foi transformada

em *E. coli* DH5-α e plaqueada em meio LB-ágar com 100 µg/mL de penicilina, e incubado overnight à 37°C. A seleção de colônias que continham o inserto desejado foi seleciona utilizando a técnica de PCR de colônia.

As colônias selecionadas contendo o fragmento desejado foram crescidas em 5 mL de LB líquido contendo 100 µg/mL de penicilina, e o DNA plasmidial foi recuperado utilizando QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O plasmídeo recuperado foi digerido pelas enzimas de restrição e então separados em gel de agarose. Uma vez confirmado o tamanho do fragmento obtido pela digestão, o fragmento foi recuperado e utilizado para a ligação com o vetor pet28-a.

#### 3.3.5. Construção no vetor de expressão pET28-a

O plasmídeo pET28-a foi linearizado através de digestão pelas enzimas de restrição, o fragmento obtido na clonagem com o vetor pGEM-T foi inserido no pet28-a, e esta construção foi transfectada em E. coli Rosetta (DE3) (Novagen) e plaqueado em LB-ágar acrescidos de 100 µg/mL de penicilina. As colônias foram selecionadas por PCR de colônia, e o tamanho do fragmento foi confirmado por digestão com enzimas de restrição.

#### 3.3.6. Expressão

Após a construção do vetor de expressão que irá gerar a proteína TcPol  $\theta$ helicase recombinante ligada à uma cauda de histidina, colônias selecionadas no passo anterior contendo esse vetor foram incubadas por 16 horas à 37°C em meio LIT acrescido de 100 µg/mL de penicilina e 40 µg/mL de clorafenicol. Após a incubação, este pré-inóculo foi adicionado a um volume final de 500 ml de meio LB líquido com a mesma concentração de antibióticos. Este inoculo foi mantido sob agitação à 180 rpm à 3 °C, sendo monitorada a densidade óptica (D.O.) em 550 nm. Quando alcançada uma D.O. entre 0.6 e 0.8 foi adicionou-se ao inoculo 1 mM de IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida). A amostra foi então incubada por 3 horas na mesma condição citada anteriormente.

#### 3.3.7. Lise

As bactérias induzidas por IPTG foram centrifugadas à 7,000g x 10 minutos e o pellet ressuspenso em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 300 mM NaCl,

1 % sarcosil, 1 mM PMSF, 1 mM DTTe um tablete de inibidor de protease EDTAfree complete protease inibitor coktail Roche). Uma vez adicionado o tampão de lise, as bactérias foram sonicadas por 30 segundos com intervalo de um minuto. Uma vez lisadas, foram centrifugadas à 20,000 g x 20 minutos à 4°C. O sobrenadante contendo a proteína de interesse solúvel foi reservado para a purificação da mesma.

#### 3.3.8. Purificação

O sobrenadante obtido da lise das bactérias foi adicionado à uma coluna de vidro 2 mL da resina de níquel (Ni-NTA Agarose Qiagen), a resina foi lavada com água milli-Q e equilibrada com 10 mL do tampão de equilíbrio (50 mM tris HCl pH 7.4, 300 mM NaCl). Em seguida, o extrato das bactérias lisadas foi adicionado à coluna para passagem através da resina pela força da gravidade. A resina foi então lavada com tampão de equilíbrio, e eluída em 3 alíquotas de 1 ml de um gradiente de imidazol.

#### 3.4. Ensaios utilizando proteínas recombinantes

#### 3.4.1. Análise de espectrometria de massa e pull down

Epimastigotas em crescimento exponencial (10<sup>9</sup>) foram lisados com 1 mL de tampão de extração (1.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.3 mM MgCl2, 0.5 mM DTT e 1% Tween 20). O extrato de epimastigotas foi centrifugado (21,000 g x 15 min), o sobrenadante foi coletado e 100 µl deste extrato protéico foi utilizado nas etapas seguintes como input em ensaios de pull-down. Os ensaios de pull-down foram realizados utilizando TcrOrc1/Cdc6 ligada a uma cauda MBP (maltose binding protein) ou TcrPolθ-helicase com cauda de histidina. Os lisados celulares foram incubados com 100 ng da proteína em um tampão de reação (50 Mm Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mM DTT e 0.1% NP40) durante 12 h à 4°C. Subsequentemente, a reação foi incubada com 100 µl de resina de níquel (Níquel-NTA agarose Qiagen) quando foi utilizada a proteína com Histidina ou 100 µl de resina de maltose (New England Biolabs) guando a proteína utilizada foi a ligada à MBP. Então, as amostras foram centrifugadas (230 g por 10 minutos) e lavadas diversas vezes com o tampão de lavagem (Tris-HCl 50 Mm pH 8.0 e DTT 0.5 mM). No final do ensaio, 50% de cada reação de *pull-down* foram fracionados por SDS-PAGE e corados com azul de Coomassie. As frações de reação de pull*down* (fração ligada) foram cortadas dos géis de poliacrilamida, coradas e fixadas com uma solução de 5% de ácido acético e 50% de metanol por 1 h. Então, as amostras foram processadas para digestão por tripsina em gel e análise por espectrometria de massa por LC/MS/MS.

A digestão em gel foi realizada de acordo com o método de Hanna et al. (2000). Cada banda de proteína foi incubada em uma solução de 50% metanol e 5% ácido acético por 3h, desidratada em 100% de acetonitrila durante 5 minutos e seco num SpeedVac. As bandas das proteínas em gel foram reduzidas usando 10 mM ditiotreitol durante 30 minutos a 56°C e depois alquilados com 50 mM lodoacetamida durante mais 30 minutos à temperatura ambiente. As frações do gel foram lavadas com 100 mM de bicarbonato de amônio três vezes por 5 minutos alternando etapas de hidratação/desidratação utilizando acetonitrila a 100%. Trinta microlitros de 50 µg/ml de tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foram adicionados aos fragmentos de gel e incubados durante 12 horas à 37°C. A digestão foi interrompida com ácido fórmico à 5%. A dessalinização das amostras foi realizada usando o Zip Tip C-18 (Millipore) de acordo com o protocolo do fabricante. Os peptídeos foram eluídos com 50% acetonitrila/TFA a 0,1% e seco até a utilização. A análise de espectrometria de massa foi realizada utilizando um espectrômetro LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) acoplado a uma cromatografia líguida de nanofluxo EASY-nLC II (Thermo Scientific) num gradiente de 35 minutos de 5 à 95% de solvente B composto por 0,1% de ácido fórmico em acetonitrilo a um caudal de 200 nl / min utilizando uma pré-coluna preparada internamente (ID 100 µm x DO 360 µm) com 5 cm de Jupiter beads C18 de 10 µm (Phenomenex, Inc.) Uma coluna analítica interna (ID 75 µm x OD 360 µm) com 15 cm de C18 5 esferas de AQUA (Phenomenex, Inc.). Os dados foram adquiridos de modo que foram selecionandos os cinco principais íons precursores em cada ciclo. A fragmentação por dissociação induzida por colisão foi excluída por 70 segundos, e realizada com uma tensão de nanospray ajustada para 2,3 kV e a temperatura da fonte ajustada para 250 ° C. O tempo de injeção de íons foi ajustado para 100 ms, e o tempo de injeção do FT-MS foi ajustado para 100 ms com uma resolução de 30.000 em um m / z de 300- 1800. Os arquivos de dados de especificação de massa brutos (.raw) foram convertidos primeiro em arquivos de formato genérico Mascot (.mgf)

usando o MSConvert (ProteoWizard Software Foundation), e os espectros MS / MS foram pesquisados usando Mascote (Matrix Science, versão 2.4.0) contra proteínas do banco de dados *Trypanosoma cruzi* baixados do UniProt. A tolerância de massa foi ajustada para 10 ppm para os precursores e a 0.5 Da para os íons do fragmento MS / MS. A tripsina foi definida para a especificidade enzimática com um máximo de 2 clivagens com carbamidometilação de cisteína incluída como a modificação fixa. O intervalo de confiança para identificação de proteínas foi estabelecido em 95% e apenas os peptídeos com um *score* iônico individual acima do limiar de identidade foram considerados corretamente identificados. Os ensaios foram realizados em três replicadas biológicas e experimentais.

#### 3.4.2. Ensaios de ligação

Os ensaios de ligação foram realizados utilizando as proteínas recombinantes purificadas rPol0-helicase com cauda de histidina 6Xhis e rTcOrc1/Cdc6 ligada à MBP. Para cada ensaio foram utilizadas quantidades equimolares de rPol-helicase e de rTcOrc1/Cdc6. Ambas as proteínas foram incubadas em tampão de reação (50 Mm Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mM DTT e 0.1% NP-40) durante 12 horas à 4°C. Subsequentemente, a reação foi incubada com 100 µl de resina de Níquel-NTA (Qiagen) ou 100 µl de resina de amilose (New England Biolabs) durante 4 horas à 4°C. Então as amostras foram centrifugadas (230 g por 10 min) e lavadas várias vezes com o tampão de lavagem (50 mM Tris-HCl pH 8.0 e DTT a 0.5 mM). No final do ensaio, 50% de cada reação de ligação foram fracionados por SDS-PAGE e submetidos à análise por western blotting. Os ensaios foram realizados em triplicata técnica e biológica.

#### 3.4.3. Ensaio de atividade de Helicase

A medida da atividade de helicase foi realizada de acordo como descrito anteriormente (28,29).O DNA de dupla fita parcial utilizado como substrato foi composto por um par de oligonucleotídeos complementares, um dos quais era marcado com digoxigenina (DIG) (5'DIG GATTGGGAGCAGGGTCAGC 3 ') e o outro biotinilado (5'biotina GCTGACCCTGCTCCCAATCGTAATCTATAGTGT CACCTA 3 '), ambos ancorados a seus respectivos 5 'terminais. Para a reação de *annealing*, os oligonucleotídeos (em concentração equimolar) foram

adicionados ao tampão de reação (HEPES 2 mM, NaCl 0.05 M, EDTA 0.1 mM, SDS a 0.01% (p / v)), aquecido à 100°C durante 5 minutos e depois incubado à 65°C durante 30 minutos. As amostras foram então incubadas à 22°C por 4 h para permitir o annealing gradual. Para a imobilização do substrato de DNA dupla fita, cada poço (da placa de 96 poços) foi revestido com com 100 µl/poço de uma solução de neutravidina a 5 µg / ml em tampão carbonato de sódio 0.5 M pH 9.3 overnight à 4°C. Os poços foram lavados com 100 µl/poço de PBS e secos à temperatura ambiente. Os poços foram subsequentemente bloqueados com a adição de 100 µl da solução de BSA à 0.1% (p / v) e incubados à 22°C durante 2 h. As placas foram então lavadas com 200 µl/poço de PBS e secas à temperatura ambiente. Subsequentemente, o substrato de DNA foi aplicado aos poços e adicionou-se a cada poço 75 µl de tampão de substrato (PBS pH 7.0 contendo NaCl 1 M e 2.5 ng do substrato de DNA após a reação de annealing), e incubado à 22°C durante 4 h. Cada poço foi lavado com 200 µl de PBS e 200 µl de 50 mM Tris HCl pH 7.5, 50 mM NaCl. As reações de helicase foram iniciadas após a adição de 90 µl do tampão de reação (11 nM de Pol0-hd purificada, 25 mM de ácido 3-N-Morfolino Propansulfônico (MOPS) pH 7.0, ATP 5 mM, DTT 2 mM, MnCl2 3 mM e 100 µg / ml de BSA]. Para o controle negativo, o tampão de reação foi aplicado em um poço sem substrato de DNA. Todas as reações foram realizadas por 60 minutos à 37°C e, em seguida, as amostras foram lavadas com 200 µl de NaCl 150 mM, seco à temperatura ambiente por 15 minutos e lavadas com tampão de detecção (0.1 M de ácido maleico, 0.15 M NaCl, 0.3%, Tween 20 pH 7.5). Posteriormente, cada poco foi preenchido com solução de bloqueio (BSA à 10% (p / v), ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5) por 30 minutos seguido por uma incubação de 30 minutos em 20 µl da solução do anticorpo (anti-Dig, Roche, 1: 10,000, 75 mU / ml do anticorpo em solução de bloqueio). Em seguida, as amostras foram lavadas com 100 µl de tampão de detecção (Tris-HCI 0.1 M, NaCI 0.1 M, pH 9.5) e, finalmente, foi aplicado à cada poço 1 µl de substrato de quimiluminescência (CSPD – 0.25 mM) e incubado por 5 minutos à 17°C. O substrato de quimiluminescência foi removido, a placa foi incubada à 37°C por 30 minutos, e a quimioluminescência da marcação de DIG remanescente foi medida em cada poço em um leitor de placas (Flex Station-Molecular Devices). Três experimentos independentes foram realizados para cada análise apresentada aqui, e os dados foram

analisados utilizando o software Prism 5 (GraphPad). Os dados quantitativos foram expressos como média ± desvio padrão, e os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste T de Student-Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de p <0,05.

#### 3.4.4. Ensaio de atividade de ATPase

A atividade de ATPase foi avaliada conforme descrito anteriormente<sup>54</sup> pelo método de Fiske e Subbarow. Um µg da proteína recombinante Pol0-helicase foi adicionado em um tampão de reação (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) com diferentes concentrações de ATP, a um volume final de 250 µl e incubado à 37 °C durante 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 15% de ácido tricloroacético. As amostras foram centrifugadas (1,000 g x 10 minutos) e 125 µl do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços e adicionado mais 63 µl da solução redutora (1% de molibdato de amônio e 180 mM de sulfato ferroso). A quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado foi quantificada baseada na linha de calibração estabelecida com padrões de Pi (0,2, 6,11 nmol / poço). O Pi foi quantificado por espectrofotometria, e a taxa de hidrólise foi determinada para cada concentração de ATP por análise de regressão linear. Valores de km e Vmax foram determinados ajustando a equação de Michaelis-Menten a um gráfico da taxa de hidrólise versus o Pi livre analisado. Pelo menos três experimentos foram realizados para cada análise.

# 3.5. Construção da proteína recombinante com TcPol $\theta$ -helicase mutada 3.5.1. Análise da estrutura do domínio helicase da DNA polimerase $\theta$

Analisamos a estrutura do domínio helicase da DNA polimerase θ de *T. cruzi* (TriTrypDB ID: TcCLB.509769.70) por modelagem, usando seis diferentes *templates* obtidos da DNA polimerase θ de humanos (helicase domain; PDB: 5A9J), que possuem resoluções entre 3.2 A e 3.5 A. O modelamento por homologia foi realizado utilizando o *Swiss-Model server* (http://swissmodel. expasy.org/) e os resultados obtidos foram refinados utilizando o software Modeller v7 [PMID: 12824332, PMID: 14696385]. Os aminoácidos a serem substituídos foram escolhidos de acordo com o motivo previamente reportado (Motivo 0 da helicase humana) quando as porções de adenina se encontravam com os nucleotídeos empilhados [PMID: 26636256]. Os motivos equivalentes no

*T. cruzi* são referentes aos resíduos I217, Y221, Q224 que foram utilizados nos experimentos seguintes de mutagêneses.

#### 3.5.2. Overlap PCR

Para gerar a pole-helicase recombinante mutada (rpole-helicase\_mut), foi realizada a técnica de extensão por overlap. Para realizar as três mutações (duas no motivo Q conservado), a extensão de overlap PCR foi realizada utilizando dois primers internos amplificando dois fragmentos do gene. O primeiro par de primers para amplificar a porção 5 'do gene foi formado por um oligo senso (Forward-1: 5'AAGCTTATGCGGGAAGACGTTCGTG) e um oligo anti-senso (Reverse-1: 5 ' GCGCCCACGGAGCCAGTTTTTTGCTGC) contendo os códons que foram mutados (negrito). O segundo par de primers para amplificar a porção 'do 3 gene foi formado um oligo senso (Forward-2: 5 por 'GCAGCaaaaaactggctcCGTGGGCGC) contendo a seguência complementar para Reverse-1, onde ocorre a sobreposição (letra minúscula), e um oligo antisenso correspondente a sequência complementar à porção final do gene (Reverse 2: 5 ' GCGGCCGCTCAGGAAGCGGTG). Para amplificar esses fragmentos, o DNA genômico da cepa Y de epimastigotas do T. cruzi foi utilizado como molde. Então, ambos os fragmentos amplificados foram usados como moldes em uma segunda reação. Nesta última reação de PCR, usamos quantidades equimolares dos fragmentos 1 e 2 (50 ng) e o par de primers Forward-1 e o Reverse-1 para amplificar a sequência completa contendo as mutações. Reações de PCR foram preparadas nas seguintes condições: 1 µl de cada iniciador (20 pmol/µl), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 1.5 µl MgCl2 (50 mM), 50 ng de DNA template, 37.8 µl H2O, 1U Platinum® Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific). Amplificação por PCR, clonagem e expressão gênica foram realizadas como descrito acima.

#### 4. RESULTADOS

#### 4.1. Busca de interatores de TcOrc1/Cdc6

Nesta seção do trabalho será descrito as etapas que foram necessárias para realizar a procura por interatores da proteína TcOrc1/Cdc6.

#### 4.1.1. Obtenção da proteína TcOrc1/Cdc6-6XHIS

Para definir possíveis interatores de TcOrc1/Cdc6 nos propusemos a realizar ensaios de *pull down*. Uma vez que, nestes ensaios, é possível recuperar e analisar o conteúdo que se liga à proteína de interesse. Portanto, para a realização do *pull down*, foi necessário que obtivéssemos TcOrc1/Cdc6 recombinante ligada à uma cauda de histina (rTcOrc1/Cdc6-6XHIS).

Figura 4.1. Expressão e purificação da proteína recombinante rTcOrc1/Cdc6-6XHIS.



(A) Gel SDS-PAGE corado com azul de coomassie de extrato total de proteínas de bactérias não induzidas (-) ou induzidas (+) com IPTG para a expressão da proteína recombinante. (B) Gel SDS-PAGE corado com azul de coomassie mostrando o esquema de purificação da proteína em coluna de níquel, sendo o extrato de bactéria utilizado como *Input* antes da interação da amostra com a resina de níquel, o *Flow trought* as proteínas que não ficaram retidas na resina, as lavagens sendo as proteínas que não foram retidas e foram retiradas com a adição do tampão de lavagem, e por fim, a eluição referente às proteínas que ficaram retidas na coluna e foram eluídas com crescentes concentrações de Imidazol.

As bactérias *E. coli* Bl21 (Rosetta) previamente transfectadas no nosso laboratório com o vetor pet28a com TcOrc1/Cdc6-6XHIS foram submetidas à indução de expressão com a adição de IPTG. A proteína expressa apresentou altura entre 55 e 45 kDa, que corresponde a aproximadamente 45 kDa de TcOrc1/Cdc6 e 1 kDa de 6xHIS (Figura 4.1 A). Após expressão em grande escala, as bactérias foram lisadas, centrifugadas e a proteína solúvel foi purificada em resina de níquel e eluída em concentrações crescentes de Imidazol (Figura 4.1 B). A proteína purificada, então, foi utilizada nos ensaios seguintes.

#### 4.1.2. Extrato enriquecido de conteúdo nuclear

Uma vez que nosso laboratório previamente demonstrou que TcOrc1/Cdc6 está ligada ao DNA durante todo o ciclo celular do epimastigota<sup>63</sup>, para os ensaios de *pull down* nossa estratégia envolveu o uso de um extrato de epimastigota enriquecido de conteúdo nuclear, reduzindo, dessa forma, contaminações de proteínas do citoplasma.

Para a obtenção desse extrato, parasitas foram lisados e centrifugados em variadas condições utilizando diferentes rotações. Uma amostra correspondente ao conteúdo encontrado no pellet e uma amostra correspondente ao sobrenadante foram obtidas. Essas duas amostras foram submetidas a separação por SDS-PAGE e, então, realizado o *immunobloting* com os anticorpos anti-Histona H3, utilizada como controle de proteínas nucleares, e anti-elF2, utilizada como controle para proteínas citoplasmáticas. Portanto, neste ensaio, conseguimos visualizar que a amostra correspondente se encontrava enriquecida com proteínas nucleares, e, desta forma, elegemos a amostra obtida no sobrenadante para os ensaios de *pull down* (Figura 4.2).

Figura 4.2 Extrato Nuclear enriquecido.



As proteínas obtidas no processo de obtenção do extrato enriquecido de núcleo foram submetidas à western blotting com os anticorpos anti-Histona H3 e anti-elF2.

#### 4.1.3. *Pull down* utilizando a proteína rTcOrc1/Cdc6-6XHIS como isca.

Como dito, o nosso objetivo preliminar era encontrar interatores da proteína TcOrc1/Cdc6, dessa forma, elegemos o ensaio de *pull down* como ferramenta para esta análise.

Para este ensaio nós incubamos previamente a proteína rTcOrc1/Cdc6-6XHIS com a resina de níquel, com a qual a histidina possui afinidade. Uma vez que rTcOrc1/Cdc6-6XHIS se liga à resina, as proteínas do extrato enriquecido de núcleo foram adicionadas à esta incubação. Como controle, incubamos as proteínas do extrato apenas com a resina, evitando dessa forma analisar proteínas que se ligariam inespecificamente à resina e não à proteína de interesse.

Após a incubação, as amostras foram lavadas para que fossem retiradas proteínas não ligadas. As amostras foram então submetidas a separação por SDS-PAGE e analisadas por espectrometria de massas. Após a exclusão das proteínas capturadas apenas pela resina (consideradas como ligação inespecífica), nós encontramos as proteínas ORC1, que denominamos como TcOrc1/Cdc6, GTPase activating protein, Heat shock 70 kDa, e DNA polymerase theta (helicase domain only) (Figura 4.3).

#### Figura 4.3. Pull down utilizando a proteína rTcOrc1/Cdc6 como isca



A proteína TcOrc1/Cdc6 foi utilizada como isca nos ensaios de *pull down* utilizando proteínas do extrato de epimastigotas de *T. cruzi*. Na primeira *lane* a proteína rTcOrc1/Cdc-6 ligada à resina utilizada como isca, na segunda *lane* o *input* do extrato nuclear, e na última *lane* as proteínas que se mantiveram ligadas à resina via rTcOrc1/Cdc6. As proteínas na fração ligada foram recortadas do gel e identificadas por espectrometria de massas.

#### 4.1.4. Análise de bioinformática

Das proteínas encontradas no ensaio de *pull down*, chamou-nos a atenção a proteína TcPolθ-helicase (DNA polimerase theta – domínio helicase), uma vez que esta proteína em mamíferos está relacionada à interação com proteínas do complexo ORC, por exemplo. Decidimos, portanto, analisar a estrutura dessa proteína.

Pol  $\theta$ , encontrada em mamíferos, apresenta um domínio C terminal de DNA polimerase, essencial para a ação de Pol  $\theta$  durante o reparo do DNA, e um domínio N terminal de helicase, que apresenta atividade ATPase dependente de DNA<sup>40</sup>. O domínio da helicase é denominado superfamília replicativa II helicase (BRR2) ou hel2 e tal como helicase e compreende dois domínios mais curtos envolvidos na função helicase (box DEAD / DEAH e HELICc), enquanto o domínio polimerase é denominado domínio DNA PolA theta (Figura 4.4). Na

genoma de tripanossomatideos (www.tritrypdb.org) plataforma do nós encontramos dois genes anotados como Pol  $\theta$ . O primeiro, localizado no cromossomo 26, anotado como DNA polymerase theta (polymerase domain only) (TcCLB.508647.170), que apresenta o domínio polimerase e por isso por nós denominado Pol  $\theta$ -polimerase. E o segundo, localizado no cromossomo 22, DNA polymerase (helicase anotado como theta domain only) (TcCLB.509769.70), que apresenta o domínio helicase e por isso denominado por nós Pol  $\theta$ -helicase. A fim de comparar a Pol  $\theta$  de *T. cruzi* com as Pol  $\theta$  de outros organismos, foi realizada uma análise in silico usando as duas següências de Pol como query (Tabela 4.1). Nossa análise in silico confirmou a identidade e similaridade dos dois genes independentes do T. cruzi (TcCLB.508647.170 e TcCLB.509769.70), que codificam os domínios helicase e polimerase separadamente, com aqueles funcionalmente anotados como Pol  $\theta$  em eucariotos superiores (Figura 4.4 e Tabela 4.1). Dois homólogos de Pol0 também existem em mamíferos, DNA polimerase nu (POLN) e helicase PolQ-like (HELQ) e encontramos BLASTP hits contra HELQ (usando Polθ-helicase de T. cruzi como query) e POLN (usando Pol $\theta$ -helicase polimerase de T. cruzi como query) (Tabela 6). Portanto, a Polθ helicase de *T. cruzi* pode ser um homólogo de HELQ, enquanto a polimerase de *T. cruzi* parece ser um homólogo de POLN.

Query ID	Query length	Subject ID	Subject length	Species	% Query	% id	% sim	e-value
TcCLB.509769.70	998	Tb927.8.3350	1057	T. brucei	90	61	74	0.00E+00
TcCLB.509769.70	998	LmjF.23.1380	2242	L. major	78	46	57	1,00E-140
TcCLB.509769.70	998	XP 004183803.1	1134	E. invadens	78	31	50	5,00E-106
TcCLB.509769.70	998	NP 498250.3	1661	C. elegans	72	31	47	3,00E-55
TcCLB.509769.70	998	NP 524333.1	2059	D. melanogaster	77	30	50	1,00E-109
TcCLB.509769.70	998	XP 009293682.1	2576	D. rerio	75	35	53	3,00E-116
TcCLB.509769.70	998	XP 416549.4	2512	G. gallus	72	35	53	1,00E-124
TcCLB.509769.70	998	AAN39838.1	2587	M. musculus	75	35	52	5,00E-120
TcCLB.509769.70	998	075417.2	2590	H. sapiens	73	34	51	2,00E-119
TcCLB.509769.70	998	XP 008662598.1 / XP 008662598	2153	Z. mays	81	34	51	2,00E-135
TcCLB.509769.70	998	XP_003310356.3	1101	P. troglodytes	80	34	55	3,00E-138
PolQ Polymerase de	main							
Query ID	Query	Subject ID	Subject	Species	%	%	%	e-value
	length		length		Query	id	sim	
	(aa)		(aa)		cov			
TcCLB.508647.170	881	Ть927.11.5550	846	T. brucei	90	38	56	0,00E+00
TcCLB.508647.170	881	LmjF.24.0890	1170	L. major	54	36	53	2,00E-94
TcCLB.508647.170	881	XP_004258142.1	591	E. invadens	29	32	51	5,00E-27
TcCLB.508647.170	881	NP_498250.3	1661	C. elegans	34	29	46	1,00E-23
TcCLB.508647.170	881	NP_524333.1	2059	D. melanogaster	35	29	49	3,00E-23
TcCLB.508647.170	881	XP_009293682.1	2576	D. rerio	33	28	46	1,00E-25
TcCLB.508647.170	881	XP_416549.4	2512	G. gallus	29	28	45	8,00E-21
TcCLB.508647.170	881	AAN39838.1	2587	M. musculus	29	31	45	4,00E-24
TcCLB.508647.170	881	075417.2	2590	H. sapiens	29	29	45	6,00E-22
	1	XP 008662598.1/						
T-CI P 508647 170	001	VD 008663508	2152	7 100 00 10	24	20	44	2 00E 21
TcCLB.508647.170	881	XP 008662598 XP 023445327.1	2153	Z. mays	34	30	44	2,00E-21 3.00E-24

Tabela 4.1. Parâmetro da análise por BLAST

## Figura 4.4. Representação esquemática da proteína DNA polimerase theta em diferentes eucariotos.



Os protozoários *T. cruzi* (Tcru), *T. brucei* (Tbru), *L. major* (Lmaj) e *Entamoeba invadens* (Einv) (sendo este último de um filo distinto comparado aos demais), apresentam dois genes independentes que codificam os domínios que podem estar associado à atividade de Pol0: helicase da superfamília replicativa II (BRR2) ou helicase ski2-like, que compreende dois domínios mais curtos envolvidos na função de helicase (DEAD / DEAH e HELICc), e o próprio domínio DNA PolA theta. Por outro lado, organismos multicelulares possuem esses mesmos domínios em um único gene/proteína Pol0. *Caenorhabditis elegans* (Cele), *Drosophila melanogaster* (Dmel), *Danio rerio* (Drer), *Galo gallus* (Ggal) e *Homo sapiens* (Hsap).

#### 4.1.5. Obtenção da proteína rTcPolθ-helicase-6XHIS

Uma vez que nos ensaios de *pull down* com rTcOrc1/Cdc6 observamos a presença de TcPol θ-helicase, proteína, que em mamíferos, está relacionada à replicação, decidimos construir uma proteína recombinante para utilizar como ferramenta em estudos específicos e para a produção de anticorpos.

Para isso, com a finalidade de obter a proteína recombinante de TcPolθ-helicase, o gene referente a esta proteína foi amplificado, e clonado no vetor pGEM. Em seguida, foi feita a transformação do vetor pGEM\_TcPolθ-helicase em bactéria *E. coli* DH5-α. Uma vez clonado, o vetor foi recuperado por Miniprep, e então digerido com as enzimas de restrição específicas. O fragmento obtido foi inserido no vetor de expressão pet28-a, e transformado em bactéria *E. coli* Bl21 (Rosetta), e a proteína fundida à cauda de histidina foi expressa após a indução com IPTG (Figura 4.5 A). Após expressão em larga escala, as bactérias foram lisadas, centrifugadas e a proteína solúvel foi purificada em resina de níquel, e eluída em concentrações crescentes de Imidazol (Figura 4.5 B).

A proteína purificada foi utilizada para a obtenção do anticorpo (Proteimax) (Figura 4.5 C), e utilizada nos ensaios seguintes.

Figura 4.5. Expressão e purificação da proteína recombinante TcPol θ-helicase-6XHIS e obtenção de anti- TcPolθ-helicase.



(A) Gel SDS-PAGE corado com azul de coomassie de extrato total de proteínas de bactérias não induzidas (-) ou induzidas (+) com IPTG para a expressão da proteína recombinante. (B) Gel SDS-PAGE corado com azul de coomassie mostrando o esquema de purificação da proteína em coluna de níquel, sendo o extrato de bactéria utilizado como *Input* antes da interação da amostra com a resina de níquel, o *Flow trought* as proteínas que não ficaram retidas na resina, as lavagens sendo as proteínas que não foram retidas e foram retiradas com a adição do tampão de lavagem, e por fim, a eluição referente às proteínas que ficaram retidas na coluna e foram eluídas com crescentes concentrações de Imidazol. (C) *Immunoblotting* do extrato total de epimastigotas de *T. cruzi* incubados com o soro de coelho antes da imunização (pré-imune) e com o soro de coelho imunizados (anti-TcPol θ-helicase).

#### 4.1.6. Obtenção da proteína rTcPolθ-polimerase-6XHIS

Apesar de não termos encontrado TcPolθ-polimerase nos ensaios de *pull down*, decidimos construir esta proteína recombinante para avaliar a presença desta no complexo de pré-replicação de *T. cruzi*. Entretanto, não conseguimos

visualizar a expressão da proteína recombinante rPolθ-polimerase, apesar de conseguirmos transfectar o gene com o vetor de expressão na bactéria competente (Figura 4.6).

В A С 180 -130 -95 -72 -55 -43 -34 -26 -IPTG

Figura 4.6 Expressão e purificação da proteína rTcPol θ-polimerase-6XHIS.

(A e B) Gel de agarose à 1 % corado com o intercalante de DNA syber safe exibindo a banda única encontrada na amplificação do gene de TcPol θ-polimerase (A) e do PCR de colônia obtido nas colônias encontradas após a transformação da bactéria com o vetor contendo o vetor e o fragmento de TcPol 0-polimerase (B) obtido. (C) Gel SDS-PAGE corado com azul de coomassie exibindo o extrato total de proteínas de bactérias não induzidas (-) ou induzidas (+) com IPTG para a expressão da proteína recombinante.

#### 4.1.7. *Pull down* utilizando a proteína rTcPolθ-helicase-6XHIS como isca.

Com a obtenção da proteína rTcPol0-helicase-6XHIS, decidimos confirmar a interação desta proteína com TcOrc1/Cdc6. Portanto, nosso primeiro passo foi realizar o ensaio de *pull down* utilizando rTcPolθ-helicase-6XHIS como isca.

Para este ensaio nós incubamos previamente a proteína rTcPol0-helicase-6XHIS com a resina de níquel, ao qual a histina possui afinidade. Uma vez que rTcPolθ-helicase-6XHIS se liga à resina, as proteínas do extrato enriquecido de núcleo foram adicionadas à esta incubação. Como controle, incubamos as proteínas do extrato apenas com a resina, evitando dessa forma analisar proteínas que se ligariam inespecificamente à resina e não à proteína de interesse.

-

Após a incubação, as amostras foram lavadas para que fossem retiradas proteínas não ligadas. As amostras foram então submetidas a separação por SDS-PAGE e analisadas por espectrometria de massas. Após a exclusão das proteínas capturadas apenas pela resina (consideradas como ligação inespecífica), nós encontramos as proteínas ORC1, que denominamos como TcOrc1/Cdc6, GTPase activating protein, Chaperonin HS60 e DNA polymerase theta (helicase domain only) (Figura 4.7).

Figura 4.7 Pull down utilizando a proteína rTcPolθ-helicase como isca.



A proteína rTcPolθ-helicase foi utilizada como isca nos ensaios de *pull down* utilizando proteínas do extrato de epimastigotas de *T. cruzi*. Na primeira *lane* a proteína rTcPolθ-helicase ligada à resina utilizada como isca, na segunda *lane* o *input* do extrato nuclear, e na última *lane* as proteínas que se mantiveram ligadas à resina via rTcPolθ-helicase. As proteínas na fração ligada foram recortadas do gel e identificadas por espectrometria de massas.

## 4.1.8. Ensaio de ligação de rTcOrc1/Cdc6-MBP com rTcPolθ-helicase-6XHIS

Após os ensaios de *pull-down* mostrarem que TcOrc1/Cdc6 é capaz de se ligar à TcPolθ-helicase e que o inverso também ocorre, nos propomos a verificar se TcPolθ-helicase e TcOrc1/Cdc6 interagiam diretamente. Para isso, realizamos um ensaio de interação proteína-proteína. Para este ensaio

utilizamos a resina de amilose, uma vez que a calda de MBP se liga por afinidade a esta. Como controle, fizemos a interação da resina de amilose com a rTcPolθhelicase-6Xhis, para evidenciar que não há ligação entre ambas, mas sim da resina de amilose com rTcOrc1Cdc6-MBP (Figura 4.8 A e B, painéis da direita). De maneira inversa, tentamos recuperar a proteína rTcOrc1Cdc6-MBP com a resina de níquel, demonstrando que não há interação entre estas, mas mostramos que a resina de níquel é capaz de interagir com rTcPolθ-helicase-6XHIS (Figura 4.8 A e B, painéis da esquerda). Demonstradas as especificidades de interação entre a proteína e resina, nós fizemos o seguinte ensaio: incubamos ambas as proteínas previamente (rTcPolθ-helicase-6XHIS e rTcOrc1/Cdc6-MBP) e então as recuperamos na resina de amilose ou de níquel (Figura 4.8 C). Notamos que, neste caso, ambas as resinas são capazes de recuperar ambas as proteínas. Estes dados demonstram a interação direta entre rTcOrc1Cdc6-MBP e rTcPolθ-helicase-6XHIS.



## Figura 4.8 Ensaio de ligação entre as proteínas rTcPolθ-helicase e rTcOrc1/Cdc6.

Géis SDS-PAGE corados com azul de coomassie referente aos ensaios de ligação. rTcOrc1/Cdc6-MBP (A), rTcPol0-helicase-6XHIS (B) ou ambas proteínas (C) foram incubadas com resina de Níquel (painéis da esquerda) ou com resina de amilose (painéis da direita). A *lane* de eluição mostra as proteínas que foram capturadas por cada resina.

#### 4.2. Caracterização de TcPol0-helicase

Nesta seção serão descritas as análises envolvidas na caracterização da proteína TcPolθ-helicase.

## 4.2.1. Domínios conservados nas proteínas TcPolθ-helicase e TcPolθpolimerase

Uma vez que evidenciamos que a proteína TcPolθ-helicase interage de fato com TcOrc1/Cdc6, iniciamos o processo de caracterização desta proteína.

Nossa primeira análise consistiu em verificar a presença de domínios conservados que pudessem conferir a esta proteína a capacidade de atuar como uma helicase. Para esta análise utilizamos como referência os dados publicados no trabalho de Newman e colaboradores<sup>64</sup>, onde é caracterizado os domínios que possivelmente conferem ao domínio helicase da proteína DNA polimerase  $\theta$ , que incluem os envolvidos na maquinaria envolvida na atividade de helicase, incluindo motivos relacionados à ligação com DNA simples fita, e todos os motivos conservados da família SF2 de helicases (motivos I-VI). Confrontando estes dados, conseguimos avaliar que TcPol $\theta$ -helicase possui todos os domínios conservados relacionados à atividade de helicase. Além disso, analisamos TcPol $\theta$ -polimerase, e constatamos que esta proteína possui os domínios conservados relacionados à atividade como uma DNA polimerase (Figura 4.9).



Figura 4.9 Representação dos domínios conservados de Pol θ.

A proteína Pol  $\theta$  de eucariotos superiores apresenta três domínios principais: um domínio polimerase no C-terminal, um domínio central e um domínio helicase no N-terminal. Análises de banco de dados genômicos de parasitas tripanossomatídeos mostraram a presença de DNA polimerase  $\theta$ , eles apresentam cópias individuais dos domínios polimerase e helicase em diferentes locus do genoma. O domínio de Helicase é representado em verde. As barras vermelhas indicam as regiões bem conservadas da família A de helicases. O domínio de DNA polimerase é representado em laranja. As barras azuis indicam as seis regiões conservadas da família A de polimerases, incluindo os motivos catalíticos A, B e C.

## 4.2.2. Verificação da atividade de ATPase de rTcPol θ-helicase na presença de ssDNA

Nossas análises nos mostraram, portanto, que TcPol θ-helicase apresenta todos os domínios relacionados a atividade de helicase conservados. Uma vez que as helicases de DNA são proteínas motoras que utilizam a energia da hidrólise do ATP para impulsionar o desenrolamento e a translocação do DNA pela helicase<sup>65</sup>, decidimos avaliar a capacidade dessa proteína de hidrolisar ATP na presença ou ausência de DNA simples fita. A hidrólise de ATP foi medida pelo fosfato inorgânico liberado por meio de um método colorimétrico. A proteína recombinante foi incubada com diferentes concentrações de ATP por 30 minutos à 37°C. A reação foi interrompida com ácido tricloro acético (TCA) 15%, e então centrifugada. Para revelação foi utilizado o sobrenadante, que foi transferido para uma placa de ELISA e acrescido de solução reveladora. O fosfato inorgânico liberado foi quantificado, e as duas condições analisadas seguiram o modelo de cinética de Michaelis-Menten (R2 = 0.9646 para a atividade sem DNA e R2= 0.9259 para a atividade mensurada na presença de DNA simples fita) (Figura 4.10). Assim como observado no domínio helicase de Pol0 em mamíferos, a afinidade de rTcPol0-helicase por ATP na presença do DNA simples fita (km 3.588 +/- 0.5845) foi maior quando comparada a afinidade na ausência do DNA simples fita (km 7.168 +/- 1.133) (Figura 4.10).





Liberação de fosfato inorgânico foi quantificado por espectrofotometria, utilizando o método de Fiske e Subarow, em incubações com concentrações crescentes de ATP com a proteína recombinante na presença ou não de DNA simples fita (ssDNA).

#### 4.2.3. Ensaio de helicase

Até este ponto, nossos dados revelaram fortes evidências que TcPolθhelicase de fato apresenta os meios necessários para atuar como uma helicase, sendo estes a capacidade de hidrolisar ATP, necessária para que a helicase se mova ao longo do DNA abrindo a dupla fita, e os domínios conservados que propiciam que a estrutura da proteína possa exercer essa função. É importante ressaltar que muitos trabalhos envolvendo o estudo do domínio helicase da proteína DNA polimerase theta falharam em demonstrar a atividade de helicase, sendo, até o momento, apenas um trabalho publicado<sup>41</sup> com evidencias da atuação como helicase dessa protéina. Assim, verificamos se a proteína TcPol  $\theta$ -helicase possui de fato atividade de helicase.

Nossa estratégia de análise envolveu a utilização de substratos oligonucleotídeos complementares, onde uma fita foi marcada com digoxinenina e a outra com biotina. Uma vez realizado o *annealing* destes oligonucleotídeos, estes foram adicionados a placas de Elisa sensibilizadas com neutravidina. Neste ensaio, na ausência da atividade de helicase os oligonucleotídeos marcados com digoxigenina são detectados com anticorpo específico, pois estão ligados a neutravidina via o oligonucleotídeo biotinilado. Na presença da atividade de helicase a dupla fita é desfeita e assim o oligonucleotídeo marcado com digoxigenina não é mais detectado (Figura 4.11 A). Com este ensaio, conseguimos verificar que, de fato, a rTcPolθ-helicase possui atividade de helicase. Além disso, esta atividade é dependente de ATP (Figura 4.11 B).

As helicases podem ser classificadas de acordo com o seu movimento em relação à cadeia de ácido nucleico à qual estão associadas. Os oligonucleótidos utilizados neste protocolo foram os descritos por Hicham Alaoui-Ismaili e colaboradores <sup>66</sup>. Outras seqüências são possíveis, mas neste caso, utilizamos esta sequência com uma região simples fita na região 3 ' do substrato para iniciar o desenovelamento da fita, o que revelou que a proteína rTcPolθ-helicase não apenas possui atividade de helicase, como também foi evidenciado que seu direcionamento apresenta-se no sentido 3' – 5'. Entretanto, ainda é necessário verificar em estudos futuros se esta rTcPolθ-helicase apresenta atividade de helicase perante substrados de RNA dupla fita, e outros tipos de substratos de DNA dupla fita.



Figura 4.11. rTcPolθ-helicase possui atividade de helicase dependente de ATP.

(A) Esquema representativo do ensaio da atividade de helicase. O substrato de DNA dupla fita utilizado foi composto por um oligonucleotídeo marcado com digoxigenina e por um oligonucleotídeo complementar marcado com biotina. O substrato de DNA foi imobilizado via biotina em uma placa coberta por uma camada de neutravidina. Após a incubação com a proteína recombinante, a atividade de helicase foi mensurada analisando a presença de oligonucleotídeos marcados com digoxigenina, identificados utilizando o anticorpo anti-digoxigenina. (B) O ensaio de helicase foi realizado com DNA ou DNA e ATP (caixa rosa – controle negativo com detecção de digoxigenina, sem atividade de helicase), sem DNA (caixa lilás – controle positivo sem detecção de digoxigenina, com atividade de helicase), e na presença de DNA e rTcPolθ-helicase na presença ou ausência de ATP (B).
Em seguida, analisamos a importância de resíduos específicos de aminoácidos para a atividade da helicase.

A estrutura do domínio da helicase da TcPol $\theta$ -helicase (TriTrypDB ID: TcCLB.509769.70) foi modelado usando seis modelos diferentes de estruturas experimentais da DNA polimerase  $\theta$  humana (domínio helicase; PDB: 5A9J), com resoluções entre 3,2 Å e 3,5 Å. A modelagem de homologia foi realizada usando o Servidor Swiss-Model (http://swissmodel.expasy.org/) e refinado com o software Modeller v7 [PMID: 12824332, PMID: 14696385]. Os aminoácidos a serem substituídos foram escolhidos de acordo com um motivo previamente relatado ("Motivo 0" da helicase humana). O equivalente a este motivo no *T cruzi* inclui os resíduos I217, Y221, Q224 que foram selecionados para os ensaios de mutação. Por *overlap* PCR (Figura 4.12 A e B), geramos a proteína recombinante Pol $\theta$ -helicase mutada (rPol $\theta$ -helicase\_mutada), que contém um S217, A221; e A224 (Figura 4.12 C). Inesperadamente, a atividade da helicase não foi suprimida pela substituição desses resíduos (Figura 4.12 D).



Figura 4.12. Análise da atividade de helicase da rTcPolθ-helicase\_mutada.

(A) Representação esquemática do ensaio de *overlap* PCR para geração do gene de rTcPolθhelicase\_mutada. (B) Gel de agarose à 1 % corado com o intercalante de DNA *syber safe* exibindo as bandas únicas encontradas nos ensaios de PCR representados em A. (C) Representação esquemática da Pol θ-helicase contendo o motivoQ. Em vermelho foram indicados os amino-ácidos que foram mutados. (D) Ensaio de helicase foi realizado com DNA ou DNA e ATP (caixa rosa – controle negativo com detecção de digoxigenina, sem atividade de helicase), sem DNA (caixa lilás – controle positivo sem detecção de digoxigenina, com atividade de helicase), e na presença de DNA e rTcPolθ-helicase\_mutada na presença ou ausência de ATP.

#### Análise funcional de TcPol0-helicase

A associação da TcPolθ-helicase com a TcOrc1/Cdc6 nos levou a questionar se esta proteína TcPolθ-helicase poderia estar envolvida com a replicação do

DNA assim como ocorre em mamíferos. Portanto, esta seção será dedicada à descrição da análise funcional de TcPolθ-helicase.

#### 4.2.4. Localização celular de TcPolθ-helicase

Uma vez que visualizamos que TcPolθ-helicase interage com TcOrc1/Cdc6, e que TcOrc1/Cdc6 localiza-se no espaço nuclear e está ligada ao DNA durante todo o ciclo celular do parasita, nós nos propomos a identificar se a TcPolθhelicase se localiza também no espaço nuclear e se há alguma interação com o DNA. Para responder esta questão, nós geramos uma linhagem de epimastigotas capazes de superexpressar Pol0-helicase fundida à GFP na porção N-terminal (GFP- Pol0-helicase). Conseguimos, portanto, detectar no espaço nuclear o sinal de GFP em 100% das células analisadas. Este dado nos mostrou que TcPol0-helicase apresenta-se no espaço nuclear durante todo o ciclo celular. Para corroborar este dado, nós analisamos o número de núcleos, cinetoplastos e flagelos das células, uma vez que este método se mostra bastante eficiente para inferir o estágio do ciclo celular de epimastigotas<sup>52</sup>. De fato, nós encontramos células apresentando sinal de GFP no espaço nuclear em todos os estágios do ciclo celular, em G1/S (contendo um núcleo, um kinetoplasto e um flagelo), G2 (um núcleo, um kinetoplasto e dois flagelos), células em mitose (um núcleo, dois kinetoplastos e dois flagelos), e células em citocinese (dois núcleos, dois kinetoplastos, dois flagelos) (Figura 4.13 A). A partir deste dado, questionamos se TcPol0-helicase, assim como mostrado com TcOrc1/Cdc6<sup>63</sup>, liga-se ao DNA e se isso poderia ocorrer em gual fase do ciclo celular. Para responder essa questão, sincronizamos células wild type com HU. A HU é um inibidor da ribonucleotídeo redutase, que age reduzindo os pools de desoxirribonucleotídeos e inibindo a replicação do DNA na fase S inicial, e tem sido usada com sucesso para sincronizar a síntese de DNA do T. cruzi<sup>67</sup>. Dessa forma, com a incubação com HU, sincronizamos as células na transição G1/S. As células sincronizadas foram lavadas para a retirada de HU e consequente progressão do ciclo celular, e, por fim, coletadas em diferentes tempos para a obtenção de células em G1, S e G2. As células coletadas foram analisadas por citometria de fluxo para análise do conteúdo de DNA (Figura 4.13 B) e submetidas ao processo de fracionamento celular, onde obtivemos as seguintes frações: Proteínas Solúveis 1 (PS1), Proteínas Solúveis 2 (PS2), que

correspondiam às proteínas não ligadas ao DNA, e a fração correspondente às Proteínas Ligadas ao DNA (PLD). As frações obtidas foram submetidas ao ensaio de *western blotting* utilizando o anticorpo anti-TcPol0-helicase e anti-Histona, este último utilizado como controle de *carregamento* (Figura 4.13 C). Neste ensaio, observamos, portanto, que a proteína TcPol0-helicase apresenta-se ligada ao DNA durante todas as fases do ciclo celular do parasita.



#### Figura 4.13 Localização de TcPolθ-helicase durante o ciclo celular do parasita.

(A) Epimastigotas superexpressando GFP-Polθ-helicase foram fixados, permeabilizados, incubados com mAbAC que reconhecem o flagelo (vermelho) e corados com DAPI (azul). N-núcleo, k-cinetoplasto, f-flagelo e \* - novo flagelo. Barras representam 2 μM. (B) Epimastigotas foram tratados com HU por 24 h. Posteriormente, as células foram lavadas e mantidas em cultura por 6 h (S), 18 h (G2) e 24 h (G1). As células foram coradas com iodeto de propídio e analisadas de acordo com o conteúdo de DNA. As linhas azuis indicam o pico da intensidade de fluorescência das células G1 / S (linha esquerda) e das células G2 / M (linha direita). (C) As amostras analisadas em (B) foram submetidas ao fracionamento celular. Neste ensaio, as células foram lisadas e, após centrifugação, os sobrenadantes foram guardados como fração solúvel 1 (SF1). Novamente, os pellets foram incubados com o tampão de lise e centrifugados, e os sobrenadantes foram reservados e designados fração solúvel 2 (SF2). Finalmente, os pellets foram tratados com DNase e depois centrifugados; os sobrenadantes foram submetidas a vestern blotting utilizando anti-TcPolθ-helicase e anti-histona H3.

#### 4.2.5. Análise da superexpressão de TcPolθ-helicase

Para analisar a funcionalidade celular TcPolθ-helicase, nós superexpressamos TcPolθ-helicase ligada à uma HA *tag* nas regiões C-terminal (Polθ-helicase-HA) ou no N-terminal (HA-Polθ-helicase). O objetivo de gerar linhagens contendo *tags* nas diferentes extremidades foi para garantir que a adição do *tag* não interferiria na conformação final da proteína e com isso na funcionalidade da mesma. Nestas linhagens que construímos, visualizamos um aumento de expressão da proteína de 2.6 e 3.8 vezes, respectivamente, comparado com o controle (Figura 4.14 A e B).





(A) Extrato proteico de células *wild type* (WT) utilizadas como controle e células superexpressoras de TcPol0-helicase fundidas a HA pelo seu terminal C (Pol0-helicase-HA) ou por seu terminal N (HA-Pol0-helicase) foram submetidas a análise por western blotting utilizando um anticorpo anti-pol0-helicase ou anti-GAPDH como controlo de *carregamento*. A Pol0-helicase endógena foi identificada como enPol0-helicase e a proteína exógena como exPol0-helicase. (B) A quantificação total de Pol0-helicase está representa no gráfico superior, e a quantificação de enPol0-helicase encontra-se no gráfico inferior (B). Os valores estão expressos como média e desvio padrão de três experimentos independentes. Foram analisadas, cem células em cada replicata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t de Student, o valor de p encontrado foi representado da seguinte forma \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001.

## 4.2.6. Monitoramento da replicação das linhagens superexpressoras de TcPolθ-helicase

Analisando o crescimento das linhagens superexpressoras, notamos que nas duas linhagens o crescimento dos parasitas estava prejudicado (Figura 4.15 A), o que poderia sugerir um problema na replicação do DNA. Portanto, para analisarmos a capacidade dessas linhagens em replicar o DNA, utilizamos como ferramenta a análise de incorporação com EdU. Observando o número de células que incorporaram EdU notamos que as linhagens superexpressoras apresentavam um número reduzido de células positivas para Edu (Figura 4.15 B). A partir deste dado nos perguntamos se a intensidade de incorporação de EdU é menor nas células que estão replicando, o que indicaria uma menor taxa de replicação ou menor número de forquilhas ativas. Para isso, nós analisamos a intensidade de fluorescência nas células positivas para EdU e comparamos com a intensidade encontrada no controle (Figura 4.15 C). De fato, constatamos que a superexpressão de Polθ-helicase resulta em células que apresentam uma replicação de DNA deficiente.





(A) Curva de crescimento de células wild tipe (WT) utilizadas como controle ou de células com superexpressão de GFP- Pol0-helicase, Pol0-helicase-HA ou HA-Pol0-helicase . (B) O gráfico mostra a porcentagem de células que incorporaram o análogo EdU. (C) A intensidade de fluorescência das células marcadas com EdU foi mensurada utilizando o software ImageJ. Os valores são expressos como média e desvio padrão de três experimentos independentes. Foram analisadas, cem células em cada replicata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t de Student, o valor de p encontrado foi representado da seguinte forma \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001.

# 4.2.7. Envolvimento da superexpressão de TcPolθ-helicase no carregamento de proteínas do complexo de pré-replicação durante as fases do ciclo celular

A deficiência na replicação do DNA nas linhagens superexpressoras de Polθhelicase nos levou a considerar que esta proteína poderia ter a mesma função que a Polθ encontrada em mamíferos, portanto, regulando negativamente o recrutamento do componente de pré-replicação MCM ao DNA<sup>43</sup>. Para verificar esta possibilidade, nós sincronizamos com HU células da linhagem HA-Polθhelicase e como controle células *wild-type*. Após a incubação com HU, as células foram mantidas em meio LIT e coletadas em diferentes períodos para obter células nas fases G1, S e G2 do ciclo celular (Fiugra 4.16 A). Além disso, analisamos e quantificamos por citometria de fluxo o ciclo celular das linhagens HA-Polθ-helicase e wild-type, e verificamos na linhagem HA-Polθ-helicase exibe um perfil de ciclo com a fase S mais longa, o que poderia sugerir menos origens de replicação sendo disparadas ou forquilhas de replicação que se movem mais lentamente, o que corrobora com o dato relacionado a diminuição da intensidade de fluorescência em células incorporando EdU (Figura 4.16 C). Estes dados indicam fortemente o envolvimento de Polθ-helicase na replicação do parasita.

Uma vez obtidas as células em diferentes fases do ciclo celular, nós analisamos por western blotting essas amostras em relação à presença e quantidade de Pol0-helicase, Orc1/Cdc6 e Mcm-7 (subunidade do complexo MCM) na fração de proteínas ligadas ao DNA (Figura 4.16 B e C). Encontramos uma grande quantidade de Pol0-helicase nas diferentes fases do ciclo na linhagem do superexpressor HA-Pol0-helicase. Além disso, os níveis de Orc1/Cdc6 encontrados na fração de proteínas ligada ao DNA foi semelhante em todas as fases do ciclo celular, tanto na linhagem do superexpressor como nas células *wild type*. Entretanto, encontramos baixos níveis de Mcm-7 na linhagem superexpressora, o que, de fato, corrobora com a nossa hipótese de que Pol0-helicase reduz o recrutamento de MCM ao DNA em *T. cruzi*.



Figura 4.16 Células superexpressando Polθ-helicase interfere no recrutamento de Mcm-7 ao DNA.

(A) Neste ensaio foram utilizadas células wild type (WT) como controle e células superexpressando HA-Polθ-helicase. As células foram sincronizadas com HU, após a liberação, as células foram mantidas em cultura durante 6, 18 e 24 h para obter células em S, G2 e G1. Estas amostras foram coradas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo. (B) As frações das células nas fases G1, S e G2 foram analisadas com o software AttuneTM NxT (Life Technologies). Três experimentos independentes foram realizados para cada análise apresentada aqui, e a análise estatística foi realizada usando o software Prism 5 (GraphPad). (C) As mesmas amostras obtidas em (A) foram submetidas ao ensaio de fracionamento celular. As proteínas ligadas ao DNA foram submetidas a *western blotting* utilizando os anticorpos anti-TcPolθ-helicase, anti-Orc1/Cdc6, anti-Mcm7 e anti-histona H3 como controle de *carregamento*. A seta preta indica Polθ-helicase endógena e a seta vermelha indica polθ-helicase exógena. (D) As bandas presentes em (C) foram quantificadas, e os valores foram expressos como a média e desvio padrão de três experimentos independentes. A quantificação da Polθ-helicase é a soma de Polθ-helicase endógena e exógena. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t de Student, \*p <0,05.</p>

N

Polo

# 4.2.8. Análise do recrutamento de MCM em células sem o domínio helicase de Polθ-helicase

Em resumo, até o presente momento demonstramos que Polô-helicase apresenta atividade de helicase e que esta proteína pode modular o recrutamento de MCM para o DNA. A partir desse conjunto de dados decidimos avaliar se a atividade de helicase dessa proteína estaria relacionada à modulação do recrutamento de MCM. Para isso, utilizamos a metodologia de CRISPR-CAS9 para gerar uma linhagem sem o domínio de helicase na proteína Polθ-helicase. Portanto, para gerar essa linhagem, induzimos a clivagem dentro do domínio helicase no C-terminal e fornecemos um DNA doador que consistia em um produto de PCR de 120 pb contendo as regiões 5' e 3', a região upstream e downstream, do domínio helicase, respectivamente. Após clivagem por Cas9, o produto obtido pela recombinação utilizando o DNA doador resultou em um novo Pole-helicase sem o domínio helicase C-terminal (Figura 26 A). Por western blot, utilizando o anti-TcPol0-helicase, nós confirmamos a geração deste mutante ( $\Delta$  domínio helicase), com a visualização de duas bandas que representam proteína wild type e a mutante (Figura 26 B). Nós então extraímos as proteínas ligadas ao DNA das células wild type e mutantes e verificamos que havia maior quantidade de Mcm-7 em células mutantes (Figura 26 C e D), sugerindo, dessa forma, que a atividade de helicase de Polo-helicase está envolvida na modulação da ligação de MCM ao DNA. Além disso, observamos nas células mutantes a redução da incorporação do análogo de timidina EdU (Figura 23 E). Porém, esperávamos que com o aumento do carregamento de MCM, nossa linhagem apresentaria aumento na replicação. Dessa forma, a deleção de parte dessa proteína ressaltou que: (i) Polô-helicase está envolvida no balanço do MCM ligado ao DNA e isto está relacionado ao seu domínio helicase; (ii) a participação de Polθ-helicase no processo da replicação do DNA pode estar atrelada a outras funções além do carregamento de MCM e por isso observamos a redução da incorporação de EdU apesar do aumento de MCM ligado a cromatina.



Figura 4.17 Deleção do domínio helicase de TcPolθ-helicase interfere no recrutamento de Mcm-7 ao DNA e na replicação do parasita.

(A) Representação esquemática da deleção do domínio helicase pela metodologia CRISPR-CAS9. Com o auxílio desta técnica geramos uma quebra de fita dupla dentro do domínio da helicase e fornecemos, como doador, um fragmento de 120 pb contendo a região 5 'e a região 3' do domínio helicase. (B) Extratos proteicos de células wild type (wt) e células da linhagem apresentando deleção do domínio de helicase (Δ Domínio Helicase) foram submetidos a *western blotting* utilizando o anticorpo de anti-TcPolθ-helicase . (C) Células wt e Δ Domínio Helicase foram processadas por fracionamento celular, onde o DNA foi tratado com DNase para liberação de proteínas ligadas ao DNA. Proteínas ligadas a DNA foram submetidas a *western blotting* utilizando anti-Mcm7 e anti-histona H3 como controle de *carregamento*. (D) As bandas presentes em (C) foram quantificadas, e os valores são expressos como média e desvio padrão de três experimentos independentes. (E) O gráfico mostra a porcentagem de células que incorporaram o análogo EdU. Os valores são expressos como média e desvio padrão de três experimentos independentes. Foram analisadas cem células em cada replicata.

# 4.2.9. Monitoramento da replicação em células com deleção parcial de Polθhelicase

Para analisar o fenótipo que Pol0-helicase pode conferir às linhagens modificadas, utilizamos a técnica de CRISPR para deletar Pol0-helicase e fazer um comparativo do fenótipo encontrado em linhagens superexpressoras. Portanto, para gerar essa linhagem, induzimos a clivagem na região 3' e 5' UTR do gene de Pol0-helicase e fornecemos um DNA doador que consistia em um produto de PCR contendo uma sequência que conferia resistência à antibióticos e também braços de homologia para as regiões 5' e 3'. Após clivagem por Cas9, o produto obtido pela recombinação utilizando o DNA doador resultou na deleção de Pol0-helicase (Figura 4.18). As células transfectadas foram selecionadas e clonadas, e utilizadas nos ensaios seguintes.



# Figura 4.18 Representação esquemática da deleção do gene de Polθ-helicase utilizando a técnica de CRISPR.

Indução da clivagem na região 3' e 5' UTR do gene de Polθ-helicase e recombinação homóloga com o DNA doador com uma sequência de resistência à antibióticos e braços de homologia para as regiões 5' e 3'.

A linhagem obtida foi submetida ao ensaio de *western blotting* utilizando o anticorpo anti-TcPolθ-helicase. Com isso, verificamos que a linhagem obtida apresentava redução na expressão de Polθ-helicase, concluindo, portanto, que a proteína foi parcialmente deletada (Figura 4.19 A e B).

Com a linhagem obtida, nosso próximo passo consistiu em analisar se a deleção parcial de Pol0-helicase influenciava na replicação das células dessa linhagem. Para isso, realizamos o ensaio de incorporação com EdU. Esperávamos que com a deleção parcial de Pol0-helicase, a nossa linhagem

apresentaria maior incorporação do análogo EdU, dessa forma, contrastando com o resultado encontrado na linhagem superexpressora. Entretanto, neste ensaio evidenciamos que a nossa linhagem KO não apresentava alterações quanto a intensidade de fluorescência, provavelmente por tratar-se de uma linhagem com deleção parcial (Figura 4.19 C).



Figura 4.19. Deleção parcial de TcPolθ-helicase.

Para a deleção de TcPolθ-helicase foi utilizada a técnica de CRISPR-Cas9. (A) As proteínas das células controle e KO (knock out) foram submetidas a análise por *western blotting*, utilizando os anticorpos anti-TcPolθ-helicase e anti-GAPDH utilizado como controle de *carregamento*. (B) A quantificação das bandas em (A) foram representadas no gráfico. (C) Células controle e KO foram submetidas à incorporação com o análogo EdU, o gráfico representa a intensidade de fluorescência apresentada pelas células analisadas. Os valores são expressos como média e desvio padrão de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t de Student, \*p <0,05.

# 4.2.10. Monitoramento do disparo de origens e velocidade da replicação na linhagem superexpressora de Polθ-helicase

Por fim, com esse conjunto de dados, começamos a nos perguntar como a modulação da ligação de MCM ao DNA poderia modular a replicação via Polθhelicase. Para elucidar esta questão realizamos o ensaio de *DNA combing*, que permite a visualização de origens de replicação em moléculas de DNA esticadas em lamínulas. Para esta análise células foram submetidas a dois pulsos, o primeiro com o análogo de timidina IdU e depois com outro análogo de timidina CldU. Utilizando anticorpos primários e secundários diferentes permite-se visualizar os pulsos em vermelho (IdU) e em verde (CldU), enquanto a simples fita de DNA é visualizada em azul. Com esta abordagem, fomos capazes de detectar origens de replicação, regiões de terminação e também a direção da forquilha (Figura 4.20 A).

Nós analisamos se alterações na taxa de replicação poderia ser uma consequência da superexpressão de Polô-helicase (4.20 C). Para isso, analisamos a velocidade de replicação das moléculas de DNA das células controle e da linhagem superexpressora HA-Pol0-helicase. A velocidade de replicação, portanto, foi obtida dividindo o tamanho dos pulsos em verde (kb) pela duração da incubação do análogo verde (20 minutos). Para esta análise, foi imprescindível que utilizássemos apenas os pulsos verdes que estivessem entre um pulso vermelho e o sinal azul do DNA, garantindo, portanto, analisar os fragmentos íntegros das moléculas que se replicaram durante o ensaio. De fato, utilizando esta abordagem foi possível observar que a linhagem superexpressora HA-Pol0-helicase apresentava uma velocidade reduzida em comparação com as células controle. Portanto, enquanto nas células controle a velocidade de replicação da forquilha foi de 1.829 +/- 0.135 kb/min, na linhagem HA-Pol0helicase a velocidade foi de apenas 1.285 +/- 0.122 kb/min. Estes resultados mostram que a progressão da forquilha de replicação foi globalmente retardada quando superexpressamos Polθ-helicase.

Além disso, analisamos a frequência de origens encontradas nas células controle e na linhagem superexpressando HA-Polθ-helicase (4.20 B). No controle 29.38 +/- 0.62 % das moléculas encontradas eram origens de

replicação, enquanto que na linhagem HA-Polθ-helicase apenas 21.25 +/- 1.25 % das moléculas continham origens de replicação. Observamos também que células superexpressando Polθ-helicase, que consequentemente apresentaram menores quantidade de MCM ligado ao DNA, dispararam um menor número de origens de replicação, apenas 21.25 +/- 1.25 % das moléculas continham origens de replicação, enquanto no controle 29.38 +/- 0.62 % das moléculas encontradas eram origens de replicação. De fato, há evidências que corroboram com a hipótese de que origens com mais MCM têm mais chances de disparar origens<sup>68</sup>.

Estes dados, portanto, associado ao aumento da fase S encontrada na linhagem superexpressora, evidenciando, dessa forma, a relevância de Polθ-helicase nos mecanismos de replicação do parasita.

Figura 4.20 A superexpressão de Polθ-helicase diminui o número de origens disparadas e a velocidade da forquilha.



Células wild type (WT) e HA-Pol0-helicase foram mantidas na presença de IdU (vermelho) e depois na presença de CldU (verde). Moléculas foram esticadas sobre lâminas e incubadas com anti-DNA (azul) para verificar a integridade das moléculas. Como a direção do forquilha é de vermelho para verde, podemos ver a direção da forquilha e identificar as regiões de terminação e origem da forquilha nas moléculas. (A). Padrões encontrados após esticar o DNA. Nas moléculas (a) e (b) só podemos ver a direção da forquilha. As moléculas (c), (d) e (e) apresentam origens de replicação e as moléculas (f) e (g) são zonas de terminação. A seta indica a direção da forquilha; \* mostra padrões considerados origens de replicação. (B) A porcentagem de moléculas contendo origens de replicação foram determinadas. Os valores apresentados referem-se a média e desvio padrão de dois experimentos independentes. Cinquenta moléculas foram analisadas em cada ensaio. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t de Student, sendo \* p <0,05. (C) O gráfico mostra a velocidade da forquilha de cada molécula analisada. O comprimento do fragmento verde em kb (entre sinais vermelho e azul) foi dividido pelo tempo do pulso verde em minutos. As análises estatísticas foram realizadas usando o teste t de Student, \*\*p <0,01.

#### 5. DISCUSSÃO

Os tripanosomatídeos são parasitas eucariotos unicelulares considerados evolutivamente bem-sucedidos, não apenas por sua capacidade de infectar numerosos tipos de organismos, mas também porque divergiram no início da escala evolutiva, aproximadamente 200-500 milhões de anos atrás<sup>58</sup>. Estes organismos são representados pelo agente da doença do sono africana, *T. brucei,* várias espécies de Leishmania spp., que causam distintos tipos de leishmaniose, e o agente etiológico da doença de Chagas, o *T. cruzi*.

Com dito, o parasita protozoário *T. cruzi* é o agente causador da doença de Chagas, uma infecção endêmica em toda a América Latina, causando altos níveis de morbidade e mortalidade. Não há vacina e os medicamentos disponíveis podem ter efeitos colaterais tóxicos, com falhas de tratamento amplamente relatadas. A conclusão do projeto genoma do *T. cruzi* proporcionou uma grande oportunidade para obter novos insights sobre a biologia do parasita, patogênese da doença e mecanismos de resistência, bem como fornecer uma estrutura melhorada para o desenvolvimento de drogas e vacinas. Embora nosso conhecimento da replicação do DNA em *T. cruzi* tenha aumentado muito na última década ainda não surgiu um quadro abrangente da complexidade da replicação do DNA e da interação de todas as moléculas envolvidas.

Neste cenário, as análises prévias das anotações dos genes de tripanosomatídeos sugeriram que as principais moléculas envolvidas na iniciação da replicação do DNA não poderiam ser encontradas nesses organismos, apesar da considerável conservação destas entre os eucariotos caracterizados. Além disso, estudos iniciais indicavam que tripanossomatideos poderiam possuir um complexo ORC semelhante a archaea, composto de apenas um fator único denominado Orc1/Cdc6<sup>54</sup>. Esta idéia, no entanto, foi superada pela identificação de mais três fatores que interagem com TbOrc1/Cdc6: uma subunidade do tipo Orc4 (TbOrc4), e dois fatores, Tb7980 e Tb3120<sup>56</sup>. Cabe dizer que as subunidades constituintes da ORC de tripanosomatídeos são altamente divergentes em relação a outras ORCs de eucariotos.

Inicialmente, neste trabalho, nos propomos a identificar e caracterizar possíveis interatores de Orc1/Cdc6, um componente do complexo de préreplicação de *T. cruzi*, afim de fornecer novos dados para compor o quadro de moléculas envolvidas na replicação do DNA do *T. cruzi*.

Para isso, nosso estudo iniciou a partir de um ensaio de *pull-down*, onde utilizamos o componente da maquinaria de replicação Orc1/Cdc6 como isca. Nesse ensaio, nos chamou a atenção a detecção da proteína Polθ-helicase. Em mamíferos, a proteína DNA polimerase  $\theta$  contém um domínio de polimerase C-terminal e um domínio semelhante a helicase N-terminal<sup>69</sup>, e nos chamou a atenção o fato de que em *T. cruzi*, nossa análise *in silico* confirmou a identidade e similaridade dos dois genes independentes (TcCLB.508647.170 e TcCLB.509769.70), que codificam os domínios helicase e polimerase separadamente, com aqueles funcionalmente anotados como Pol  $\theta$  em eucariotos superiores.

Entretanto, neste ensaio, não houve a detecção de Pol θ-polimerase levantando a questão de que se no *T. cruzi* apenas o domínio Polθ-helicase está envolvido a eventos associados ao complexo de pré-replicação; no entanto, outros componentes deste complexo, tais como outras subunidades de ORC e Mcms, também não foram detectadas neste ensaio.

Uma vez que em mamíferos, já foi relatado a interação de Pol θ com componentes da maquinaria de replicação<sup>43</sup>, nós nos propomos a investigar melhor a associação entre Orc1/Cdc6 e Polθ-helicase. Com isso, realizamos um ensaio de ligação *in vitro* e observamos que Pol θ-helicase está diretamente ligado a Orc1/Cdc6, fato não demonstrado em células de mamíferos, onde os ensaios detectaram a interação de Polθ-helicase e CPR através de ensaios de imunoprecipitação. Entretanto, mais estudos serão importantes para mostrar quando Polθ-helicase interage com Orc1/Cdc6 durante a montagem do complexo de pré-replicação.

A partir disso, este conjunto de dados nos impulsionou a criar linhagens de epimastigotas modificadas para avaliar Polθ-helicase em eventos de replicação do parasita. Inicialmente, nos chamou a atenção o fato de Pol θ-helicase assim como Orc1/Cdc6 estar ligado ao DNA aparentemente durante todo o ciclo

celular, sugerindo fortemente que Polθ-helicase pode ser de fato um componente constitutivo da maquinaria de pré-replicação.

Portanto, para investigar o possível papel da Pol0-helicase na replicação do DNA, construímos uma linhagem celular que superexpressou a Pol0-helicase fundida em HA na porção N-terminal (HA-Pol0-helicase). Observamos nessa linhagem a redução na porcentagem de células replicando. Além disso, mesmo nas células que replicaram, a incorporação de análogos de timidina foi reduzida. Durante a investigação de como Polo-helicase poderia modular a replicação do DNA descobrimos que a superexpressão da Polo-helicase resulta em uma alta quantidade de Pol0-helicase ligada ao DNA e em uma quantidade reduzida de Mmc7 ligada à cromatina. Como o complexo MCM é montado antes de ser recrutado para o DNA<sup>6</sup>, a quantidade reduzida de Mcm7 no DNA pode significar que a quantidade de todas as subunidades de MCM é reduzida na cromatina. de mamíferos<sup>43</sup>, e aqui, mostramos que a superexpressão de apenas Polohelicase (sem o domínio da polimerase) tem o mesmo efeito. Como nos mamíferos, os mecanismos envolvidos na modulação negativa do recrutamento de MCM pela Pol0-helicase ainda precisam ser elucidados. É possível que MCM e Pole-helicase compitam por Orc1/Cdc6, embora não saibamos se MCM e Orc1/Cdc6 estão diretamente associados no T. cruzi.

Notamos que as células superexpressando Pol θ helicase е consequentemente apresentando menor quantidade de MCM no DNA disparam um menor número de origens de replicação. De fato, evidências apoiam a ideia de que origens com mais MCM têm maior chance de disparar<sup>70</sup>. Nossos dados também mostram que uma quantidade menor de MCM no DNA diminui a velocidade da forquilha. Já foi proposto que o MCM pode controlar a estabilização de replissomos através de sua fosforilação<sup>71</sup>. Portanto, é possível que a menor velocidade da forquilha de DNA visualizada aqui seja consequência da desestabilização do replisomo causada por uma quantidade menor de MCM. Além disso, essa diferença entre a taxa de replicação nesses dois cenários já havia sido demonstrada na superexpressão de células de câncer de mama<sup>72</sup>.

Para estudarmos melhor o fenótipo atrelado a expressão de Polθ-helicase, utilizando a metodologia de CRISPR-Cas9, onde geramos uma linhagem que

possui expressão de Polθ-helicase (59%) reduzida. Entretanto, nestas células, não observamos alterações na replicação do DNA, provavelmente porque seriam necessários outros fatores limitantes para modular o processo de replicação.

Além disso, uma vez que mostramos que Pol0-helicase apresenta atividade de helicase e que Pol0-helicase modula o recrutamento de MCM no DNA, nós avaliamos a participação dessa atividade de helicase no envolvimento do recrutamento de MCM por Pol0-helicase. Para isso, nós usamos a metodologia de CRISPR-Cas9 para gerar uma linhagem que expressa a Pol0-helicase sem o domínio de helicase. Essa linhagem de fato apresentou mais MCM no DNA, e nós esperávamos que a porcentagem de células incorporando EdU fosse similar, ou até maior, ao que é encontrado em células *wild-type*. Uma explicação para essa observação é que a atividade de helicase é importante para outras funções na replicação além do recrutamento de MCM.

Juntos nossos dados apresentam a Polθ-helicase como um novo controle da replicação do DNA no *T. cruzi.* Sabe-se que a instabilidade da forquilha e o aumento aberrante da velocidade da forquilha contribuem para danos no DNA em eucariotos, e que esses danos podem resultar em mutações do DNA como translocações, perdas de material cromossômico, amplificações, duplicações ou inversões de genes, substituição de pares de bases. Nossos dados sugerem que Polθ- helicase pode atuar negativamente no controle da replicação. Esse controle negativo observado em células superexpressando Polθ-helicase poderia estar associado a manutenção da estabilidade genômica, onde Polθhelicase controlaria a velocidade da forquilha de replicação. Neste contexto, a nossa proposta é que a célula poderia controlar a velocidade da forquilha através da disponibilidade de Polθ-helicase e com isso controlar sua estabilidade genômica, fundamental para sobrevivência da espécie e também sua instabilidade genômica, importante para o sucesso da infecção.

Uma vez que alguns componentes envolvidos no licenciamento de origens de replicação são muito divergentes no Trypanosoma, a presença de Polθhelicase neste processo, bem como em células de mamíferos, sugere fortemente que a Polθ-helicase poderia estar envolvida em um controle central, preservado durante a evolução. O fato de que a superexpressão apenas do domínio Polθ-helicase modula a replicação do DNA indica que, se a Polθ-polimerase é parte deste controle, não é um fator limitante. No entanto, o envolvimento de Polθ-helicase na modulação da replicação do DNA levanta a questão de seu envolvimento na manutenção do genoma e na plasticidade genômica observada neste organismo, que são duas características essenciais que garantem o sucesso da infecção no hospedeiro mamífero.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho apresentamos a proteína Pol0-helicase como um interator da proteína Orc1/Cdc6, e caracterizamos o papel desta na replicação do *T. cruzi.* Além disso, também demonstramos que a Pol0-helicase exibe atividade de helicase e ATPásica, que são aumentadas na presença de DNA simples fita. Juntos, nossos dados revelaram que Pol0-helicase controla o carregamento de MCM7 no DNA, interfere no disparo de origens e com isso atua no controle da replicação do DNA.

### 7. REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet (revised in June 2010). Wkly Epidemiol Rec, v. 85, n. 34, p. 334-6, Aug 2010. ISSN 0049-8114. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20726172</u> >.
- <sup>2</sup> CAROD-ARTAL, F. J. American trypanosomiasis. Handb Clin Neurol, v. 114, p. 103-23, 2013. ISSN 0072-9752. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23829903</u> >.
- <sup>3</sup> SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 102 Suppl 1, p. 75-85, Oct 2007.
   ISSN 0074-0276. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17891282</u> >.
- <sup>4</sup> COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature, v. 465, n. 7301, p. S6-7, Jun 2010. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20571554</u> >.
- <sup>5</sup> SALES JUNIOR, P. A. et al. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. Am J Trop Med Hyg, v. 97, n. 5, p. 1289-1303, Nov 2017. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29016289</u> >.
- <sup>6</sup> BELL, S. P.; DUTTA, A. DNA replication in eukaryotic cells. Annu Rev Biochem, v. 71, p. 333-74, 2002. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045100">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045100</a> >.
- <sup>7</sup> PARDEE, A. B. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 71, n. 4, p. 1286-90, Apr 1974. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4524638</u> >.
- STILLMAN, B. et al. DNA replication and the cell cycle. Ciba Found Symp, v. 170, p. 147-56; discussion 156-60, 1992. ISSN 0300-5208. Disponível em: <</p>
  <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1336449</u> >.
- <sup>9</sup> PINES, J.; JACKMAN, M.; SIMPSON, K. Assays for CDK activity and DNA replication in the cell cycle. **Curr Protoc Cell Biol**, v. Chapter 8, p. Unit 8.2, May 2001. ISSN 1934-2616. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18228387</u> >.
- <sup>10</sup> GLOTZER, M. Animal cell cytokinesis. **Annu Rev Cell Dev Biol,** v. 17, p. 351-86, 2001. ISSN 1081-0706. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687493</u> >.
- <sup>11</sup> WU, L.; LIU, Y.; KONG, D. Mechanism of chromosomal DNA replication initiation and replication fork stabilization in eukaryotes. Sci China Life Sci, v. 57, n. 5, p. 482-7, May 2014. ISSN 1869-1889. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24699916</u> >.

- <sup>12</sup> LI, H.; STILLMAN, B. The origin recognition complex: a biochemical and structural view. Subcell Biochem, v. 62, p. 37-58, 2012. ISSN 0306-0225. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22918579</u> >.
- LEI, M. The MCM complex: its role in DNA replication and implications for cancer therapy. Curr Cancer Drug Targets, v. 5, n. 5, p. 365-80, Aug 2005. ISSN 1568-0096.
   Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16101384</u> >.
- <sup>14</sup> COSTA, A.; HOOD, I. V.; BERGER, J. M. Mechanisms for initiating cellular DNA replication. Annu Rev Biochem, v. 82, p. 25-54, 2013. ISSN 1545-4509. Disponível em:
   < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23746253</u> >.
- <sup>15</sup> STINCHCOMB, D. T.; STRUHL, K.; DAVIS, R. W. Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator. **Nature**, v. 282, n. 5734, p. 39-43, Nov 1979. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/388229</u> >.
- JAZWINSKI, S. M.; EDELMAN, G. M. Protein complexes from active replicative fractions associate in vitro with the replication origins of yeast 2-micrometers DNA plasmid.
   Proc Natl Acad Sci U S A, v. 79, n. 11, p. 3428-32, Jun 1982. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7048304</u> >.
- <sup>17</sup> SHORE, D.; NASMYTH, K. Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. **Cell**, v. 51, n. 5, p. 721-32, Dec 1987. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3315231</u> >.
- <sup>18</sup> LI, J. J.; HERSKOWITZ, I. Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. **Science**, v. 262, n. 5141, p. 1870-4, Dec 1993. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8266075</u> >.
- <sup>19</sup> BELL, S. P.; STILLMAN, B. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. Nature, v. 357, n. 6374, p. 128-34, May 1992.
   ISSN 0028-0836. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1579162</u> >.
- <sup>20</sup> MUZI-FALCONI, M.; KELLY, T. J. Orp1, a member of the Cdc18/Cdc6 family of S-phase regulators, is homologous to a component of the origin recognition complex. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 92, n. 26, p. 12475-9, Dec 1995. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8618924">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8618924</a> >.
- <sup>21</sup> GOSSEN, M. et al. A Drosophila homolog of the yeast origin recognition complex. Science, v. 270, n. 5242, p. 1674-7, Dec 1995. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7502079</u> >.

- ROMANOWSKI, P. et al. The Xenopus origin recognition complex is essential for DNA replication and MCM binding to chromatin. Curr Biol, v. 6, n. 11, p. 1416-25, Nov 1996.
   ISSN 0960-9822. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8939603</u> >.
- <sup>23</sup> RANDELL, J. C. W.; BOWERS, J. L.; , H. K. R. Sequential ATP Hydrolysis by Cdc6 and ORC Directs Loading of the Mcm2-7 Helicase. Disponível em: < <u>http://dx.doi.org/10.1038/nsmb1002</u> >.
- <sup>24</sup> MASAI, H.; TANAKA, T.; KOHDA, D. Stalled replication forks: making ends meet for recognition and stabilization. **Bioessays**, v. 32, n. 8, p. 687-97, Aug 2010. ISSN 1521-1878. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20658707</u> >.
- LASKEY, R. A.; MADINE, M. A. A rotary pumping model for helicase function of MCM proteins at a distance from replication forks. EMBO Rep, v. 4, n. 1, p. 26-30, Jan 2003.
   ISSN 1469-221X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12524516</u> >.
- DIMITROVA, D. S.; GILBERT, D. M. DNA replication and nuclear organization: prospects for a soluble in vitro system. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, v. 9, n. 3-4, p. 353-61, 1999. ISSN 1045-4403. Disponível em: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10651252">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10651252</a> >.
- <sup>27</sup> DAS, M. et al. MCM Paradox: Abundance of Eukaryotic Replicative Helicases and Genomic Integrity. **Mol Biol Int,** v. 2014, p. 574850, 2014. ISSN 2090-2182. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25386362</u> >.
- LEI, M.; TYE, B. K. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. J Cell Sci, v. 114, n. Pt 8, p. 1447-54, Apr 2001. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11282021</u> >.
- PETOJEVIC, T. et al. Cdc45 (cell division cycle protein 45) guards the gate of the Eukaryote Replisome helicase stabilizing leading strand engagement. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 112, n. 3, p. E249-58, Jan 2015. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25561522</u> >.
- <sup>30</sup> STUKENBERG, P. T.; TURNER, J.; O'DONNELL, M. An explanation for lagging strand replication: polymerase hopping among DNA sliding clamps. **Cell,** v. 78, n. 5, p. 877-87, Sep 1994. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8087854</u> >.
- <sup>31</sup> JONES, R. M.; PETERMANN, E. Replication fork dynamics and the DNA damage response. **Biochem J,** v. 443, n. 1, p. 13-26, Apr 2012. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22417748</u> >.
- <sup>32</sup> JAIN, R.; AGGARWAL, A. K.; RECHKOBLIT, O. Eukaryotic DNA polymerases. Curr Opin Struct Biol, v. 53, p. 77-87, Dec 2018. ISSN 1879-033X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30005324</u> >.

- <sup>33</sup> CROUCH, J. D.; BROSH, R. M. Mechanistic and biological considerations of oxidatively damaged DNA for helicase-dependent pathways of nucleic acid metabolism. Free Radic Biol Med, v. 107, p. 245-257, 06 2017. ISSN 1873-4596. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27884703 >.
- <sup>34</sup> BROSH, R. M. DNA helicases involved in DNA repair and their roles in cancer. Nat Rev Cancer, v. 13, n. 8, p. 542-58, Aug 2013. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23842644</u> >.
- <sup>35</sup> UMATE, P.; TUTEJA, N.; TUTEJA, R. Genome-wide comprehensive analysis of human helicases. **Commun Integr Biol,** v. 4, n. 1, p. 118-37, Jan 2011. ISSN 1942-0889. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21509200</u> >.
- <sup>36</sup> BRAITHWAITE, D. K.; ITO, J. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. Nucleic Acids Res, v. 21, n. 4, p. 787-802, Feb 1993. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8451181</u> >.
- YAMTICH, J.; SWEASY, J. B. DNA polymerase family X: function, structure, and cellular roles. Biochim Biophys Acta, v. 1804, n. 5, p. 1136-50, May 2010. ISSN 0006-3002.
   Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19631767</u> >.
- <sup>38</sup> HOGG, M. et al. Lesion bypass activity of DNA polymerase θ (POLQ) is an intrinsic property of the pol domain and depends on unique sequence inserts. J Mol Biol, v. 405, n. 3, p. 642-52, Jan 2011. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050863">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050863</a> >.
- <sup>39</sup> SEKI, M.; MARINI, F.; WOOD, R. D. POLQ (Pol theta), a DNA polymerase and DNAdependent ATPase in human cells. Nucleic Acids Res, v. 31, n. 21, p. 6117-26, Nov 2003. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14576298</u> >.
- WOOD, R. D.; DOUBLIÉ, S. DNA polymerase θ (POLQ), double-strand break repair, and cancer. DNA Repair (Amst), v. 44, p. 22-32, Aug 2016. ISSN 1568-7856. Disponível em:
   < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27264557</u> >.
- <sup>41</sup> OZDEMIR, A. Y. et al. Polymerase θ-helicase efficiently unwinds DNA and RNA-DNA hybrids. **J Biol Chem,** v. 293, n. 14, p. 5259-5269, Apr 2018. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29444826</u> >.
- BEAGAN, K.; MCVEY, M. Linking DNA polymerase theta structure and function in health and disease. Cell Mol Life Sci, v. 73, n. 3, p. 603-15, Feb 2016. ISSN 1420-9071.
   Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26514729</u> >.

- <sup>43</sup> FERNANDEZ-VIDAL, A. et al. A role for DNA polymerase θ in the timing of DNA replication. **Nat Commun**, v. 5, p. 4285, 2014. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24989122">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24989122</a> >.
- <sup>44</sup> CHAN, S. H.; YU, A. M.; MCVEY, M. Dual roles for DNA polymerase theta in alternative end-joining repair of double-strand breaks in Drosophila. PLoS Genet, v. 6, n. 7, p. e1001005, Jul 2010. ISSN 1553-7404. Disponível em: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20617203">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20617203</a> >.
- <sup>45</sup> GOFF, J. P. et al. Lack of DNA polymerase theta (POLQ) radiosensitizes bone marrow stromal cells in vitro and increases reticulocyte micronuclei after total-body irradiation. **Radiat Res,** v. 172, n. 2, p. 165-74, Aug 2009. ISSN 0033-7587. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19630521</u> >.
- SEKI, M.; WOOD, R. D. DNA polymerase theta (POLQ) can extend from mismatches and from bases opposite a (6-4) photoproduct. DNA Repair (Amst), v. 7, n. 1, p. 119-27, Jan 2008. ISSN 1568-7864. Disponível em: <</li>
   <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17920341">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17920341</a> >.
- <sup>47</sup> MATEOS-GOMEZ, P. A. et al. The helicase domain of Polθ counteracts RPA to promote alt-NHEJ. Nat Struct Mol Biol, v. 24, n. 12, p. 1116-1123, Dec 2017. ISSN 1545-9985. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29058711</u> >.
- <sup>48</sup> TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited. Int J Parasitol, v. 31, n. 5-6, p. 472-81, May 2001. ISSN 0020-7519. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334932 >.
- <sup>49</sup> BRENER, Z.; CHIARI, E. [MORPHOLOGICAL VARIATIONS OBSERVED IN DIFFERENT STRAINS OF TRYPANOSOMA CRUZI]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 5, p. 220-4, 1963
   Sep-Oct 1963. ISSN 0036-4665. Disponível em: <</li>
   <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14110094</u> >.
- <sup>50</sup> DE SOUZA, W. Basic cell biology of Trypanosoma cruzi. **Curr Pharm Des,** v. 8, n. 4, p. 269-85, 2002. ISSN 1381-6128. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860366</u> >.
- SCHENKMAN, S. et al. A novel cell surface trans-sialidase of Trypanosoma cruzi generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. Cell, v. 65, n. 7, p. 1117-25, Jun 1991. ISSN 0092-8674. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1712251 >.
- <sup>52</sup> ELIAS, M. C. et al. Morphological events during the Trypanosoma cruzi cell cycle. Protist, v. 158, n. 2, p. 147-57, Apr 2007. ISSN 1434-4610. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17185034</u> >.

- EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease. Science, v. 309, n. 5733, p. 409-15, Jul 2005. ISSN 1095-9203.
   Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020725 >.
- <sup>54</sup> GODOY, P. D. et al. Trypanosome prereplication machinery contains a single functional orc1/cdc6 protein, which is typical of archaea. Eukaryot Cell, v. 8, n. 10, p. 1592-603, Oct 2009. ISSN 1535-9786. Disponível em: <</li>
   <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19717742</u> >.
- <sup>55</sup> DANG, H. Q.; LI, Z. The Cdc45·Mcm2-7·GINS protein complex in trypanosomes regulates DNA replication and interacts with two Orc1-like proteins in the origin recognition complex. **J Biol Chem,** v. 286, n. 37, p. 32424-35, Sep 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21799014</u> >.
- <sup>56</sup> TIENGWE, C. et al. Identification of ORC1/CDC6-interacting factors in Trypanosoma brucei reveals critical features of origin recognition complex architecture. PLoS One, v. 7, n. 3, p. e32674, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22412905">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22412905</a> >.
- <sup>57</sup> MARQUES, C. A. et al. Diverged composition and regulation of the Trypanosoma brucei origin recognition complex that mediates DNA replication initiation. Nucleic Acids Res, Mar 2016. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26951375</u> >.
- DA SILVA, M. S. et al. Nuclear DNA Replication in Trypanosomatids: There Are No Easy Methods for Solving Difficult Problems. Trends Parasitol, v. 33, n. 11, p. 858-874, 11 2017. ISSN 1471-5007. Disponível em: <</li>
   <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28844718">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28844718</a> >.
- <sup>59</sup> \_\_\_\_\_. Differences in the Detection of BrdU/EdU Incorporation Assays Alter the Calculation for G1, S, and G2 Phases of the Cell Cycle in Trypanosomatids. **J Eukaryot Microbiol,** v. 64, n. 6, p. 756-770, Nov 2017. ISSN 1550-7408. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28258618</u> >.
- TAKAGI, S. et al. Detection of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdUrd) incorporation with monoclonal anti-BrdUrd antibody after deoxyribonuclease treatment. Cytometry, v. 14, n. 6, p. 640-8, 1993. ISSN 0196-4763. Disponível em: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8404370">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8404370</a> >.
- <sup>61</sup> PILKINTON, M. et al. Mip/LIN-9 can inhibit cell proliferation independent of the pocket proteins. **Blood Cells Mol Dis,** v. 39, n. 3, p. 272-7, 2007 Nov-Dec 2007. ISSN 1079-9796. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17618148</u> >.
- <sup>62</sup> BENEKE, T. et al. A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. **R Soc Open Sci,** v. 4, n. 5, p. 170095, May 2017. ISSN 2054-5703. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28573017</u> >.

- <sup>63</sup> CALDERANO, S. et al. ORC1/CDC6 and MCM7 distinct associate with chromatin through Trypanosoma cruzi life cycle. Mol Biochem Parasitol, v. 193, n. 2, p. 110-3, Feb 2014. ISSN 1872-9428. Disponível em: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24681203">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24681203</a> >.
- <sup>64</sup> NEWMAN, J. A. et al. Structure of the Helicase Domain of DNA Polymerase Theta Reveals a Possible Role in the Microhomology-Mediated End-Joining Pathway.
   Structure, v. 23, n. 12, p. 2319-30, Dec 2015. ISSN 1878-4186. Disponível em: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26636256">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26636256</a> >.
- <sup>65</sup> FRICK, D. N.; LAM, A. M. Understanding helicases as a means of virus control. Curr Pharm Des, v. 12, n. 11, p. 1315-38, 2006. ISSN 1381-6128. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611118</u> >.
- <sup>66</sup> HICHAM ALAOUI-ISMAILI, M. et al. A novel high throughput screening assay for HCV NS3 helicase activity. Antiviral Res, v. 46, n. 3, p. 181-93, Jun 2000. ISSN 0166-3542.
   Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10867156</u> >.
- <sup>67</sup> GALANTI, N. et al. Hydroxyurea-induced synchrony of DNA replication in the Kinetoplastida. **Exp Cell Res,** v. 214, n. 1, p. 225-30, Sep 1994. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8082726</u> >.
- <sup>68</sup> DAS, S. P. et al. Replication timing is regulated by the number of MCMs loaded at origins. **Genome Res,** v. 25, n. 12, p. 1886-92, Dec 2015. ISSN 1549-5469. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26359232</u> >.
- <sup>69</sup> MAGA, G. et al. DNA polymerase theta purified from human cells is a high-fidelity enzyme. J Mol Biol, v. 319, n. 2, p. 359-69, May 2002. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12051913</u> >.
- DAS, S. P.; RHIND, N. How and why multiple MCMs are loaded at origins of DNA replication. Bioessays, v. 38, n. 7, p. 613-7, 07 2016. ISSN 1521-1878. Disponível em: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27174869">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27174869</a> >.
- <sup>71</sup> ALVER, R. C. et al. Reversal of DDK-Mediated MCM Phosphorylation by Rif1-PP1 Regulates Replication Initiation and Replisome Stability Independently of ATR/Chk1.
   Cell Rep, v. 18, n. 10, p. 2508-2520, Mar 2017. ISSN 2211-1247. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28273463 >.
- <sup>72</sup> LEMÉE, F. et al. DNA polymerase theta up-regulation is associated with poor survival in breast cancer, perturbs DNA replication, and promotes genetic instability. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 107, n. 30, p. 13390-5, Jul 2010. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624954</u> >.