SIMONE GUEDES CALDERANO

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

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

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

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

Versão original

São Paulo
2013

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

1.1 Ciclo Celular: Ciclinas e CDKs

O ciclo celular é composto por quatro fases subsequentes: G1 (*Gap*1), S (Síntese de DNA), G2 (*Gap2)* e mitose (M). A sua progressão é regida pela ação de diferentes combinações de ciclinas-CDKs (cy*clin dependent kinase*).

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

1.1.1 Transição G1/S

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

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

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

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

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

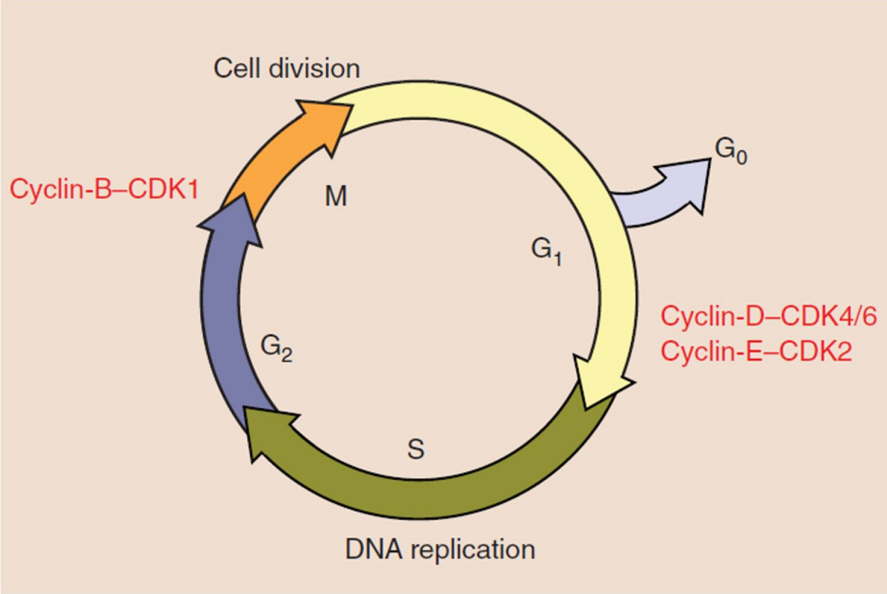
A inibição de ciclinas E não impede a entrada de células em G1 para S, porém a proliferação celular torna-se mais lenta e também há a diminuição da resposta celular a estímulos mitogênicos (6). Já a superexpressão de ciclinas E tem sido frequentemente observada em vários tipos de câncer com agressividade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

1.1.2 Progressão S/G2 e G2/M

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

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

Figura 1.1- Principais ciclinas-CDKs envolvidas na progressão do ciclo celular.



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

1.2 Complexo de Pré-Replicação

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

As origens de replicação são sequencias de DNA na qual a replicação irá iniciar. Em bactérias e leveduras a sequência dessas origens é conhecida (9, 10), porém em eucariotos superiores não foi encontrada sequência específica para essas origens de replicação, estando essas associadas ao estado de abertura da cromatina em virtude dos eventos que a envolvem, como a transcrição por exemplo (11).

As proteínas responsáveis em reconhecer as origens de replicação e formar o CPR são similares de bactérias a eucariotos superiores, porém conforme aumenta a complexidade celular há também o aumento da complexidade do CPR como será mostrado a seguir.

1.2.1 Bactérias

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

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

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

1.2.2 Leveduras e Metazoários

1.2.2.1 <u>Origens de Replicação Específicas</u>

Com material genético maior que o presente em bactérias, sendo cerca de 12Mpb em leveduras e 3000Mbp em Humanos, e velocidade da forquilha de replicação é menor (aproximadamente 2kb/min em leveduras (16)] e 2-3kb/min em

humanos (15)]) o início da replicação ocorre em múltiplas origens para poder permitir a duplicação do material genético dentro do “prazo” da fase S.

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

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

1.2.2.2 Proteínas do Complexo de Pré-Replicação

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

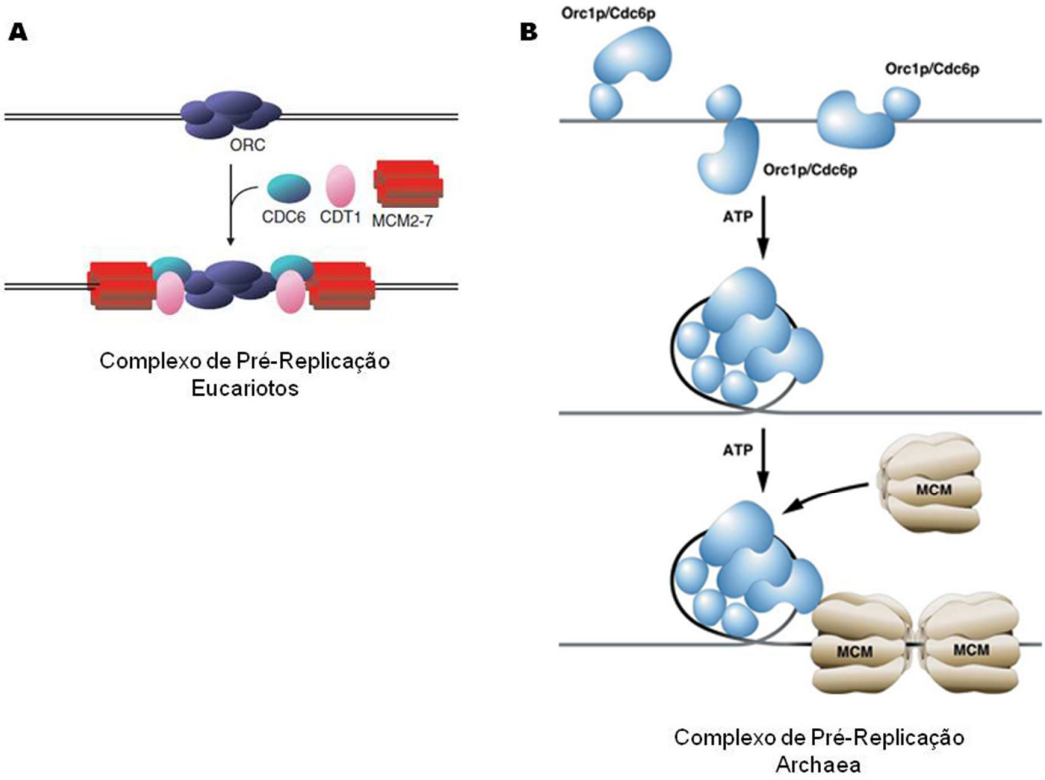
Primeiramente um complexo formado por seis subunidades denominado *Origin Recognition Complex* de 1 a 6 (ORC_{1-6}) se liga a origem de replicação e recruta outras duas proteínas Cdc6 (*Cell Division Cycle*) e Cdt1 (*Cdc10-dependent transcript factor 1*). Esta última recruta outro complexo formado por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

O complexo MCM_{2-7} que chega por último na formação do complexo de pré-replicação é constituído por seis proteínas que são as Mcm2 a Mcm7. Este complexo, que possui forma de anel e apresenta atividade de helicase, envolve DNA dupla fita (22) e tem por função abrir a dupla fita de DNA para que este possa ser duplicado por ação das DNA polimerases (21, 23). Tem-se observado que as MCMs

são indispensáveis no processo de replicação, pois quando são inibidas na fase S há uma abrupta interrupção da síntese de DNA (24, 25).

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

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

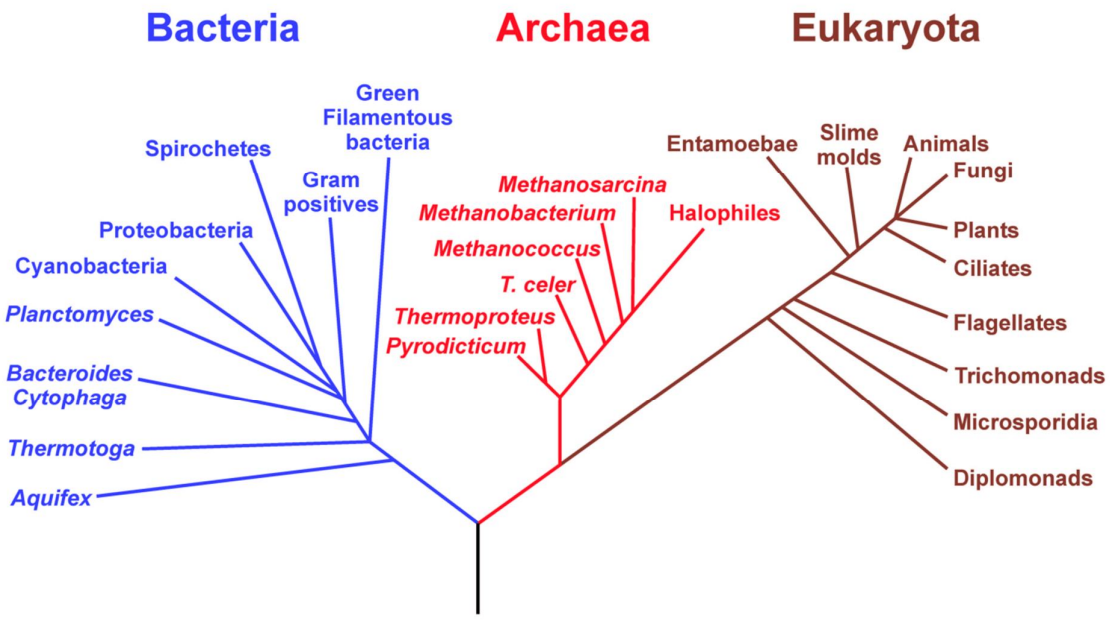


Em (A) o Complexo de Pré-Replicação de eucariotos formado por $ORC_{1\text{-}6}$, CDC6, CDT1 e MCM $_{2\text{-}7}$ (20). Em (B) o CPR de archaea formado por ORC/CDC6 e complexo MCM, onde é sugerido que ORC/CDC6 forme um complexo semelhante ao de eucariotos (27).

1.2.3 Archaea

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

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



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

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

1.3 Replicação do DNA em Eucariontes

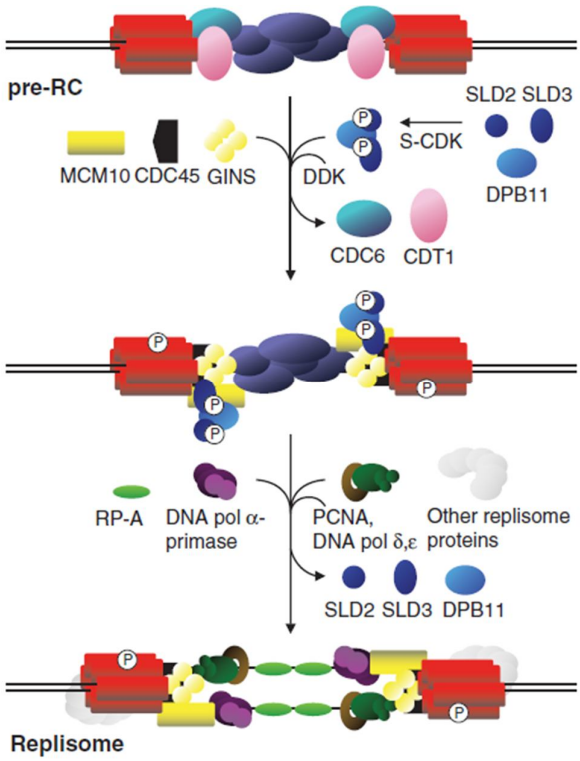
Após a formação dos complexos de pré-replicação na transição M/G1, ocorre a ativação desses complexos na entrada de S para que a replicação seja efetivamente iniciada. Assim as proteínas quinases CDKs de fase S (ciclina E-CDK2 e ciclinaA-CDK2) e também CDC7-DBF4 (em leveduras) desempenham importante função neste processo de ativação por meio de fosforilação de subunidades de MCM2-7, liberação de CDC6 e recrutamento de MCM10. CDKs também fosforilam as proteínas SLD2 e SLD3 que resulta na formação do complexo SLD2-SLD3-DPB11 (TopBP1) que juntamente com MCM10 recrutam CDC45. O complexo SLD2-SLD3-DPB11 também desempenha importante função no recrutamento do complexo GINS (formado por 4 proteínas: Sld5, Psf1 , Psf2 e Psf3) (20, 31).

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

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

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

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



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

1.3.1 Controle da Replicação

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

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

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

1.3.1.1 ORC $_{1-6}$

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

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

1.3.1.2 Cdc6

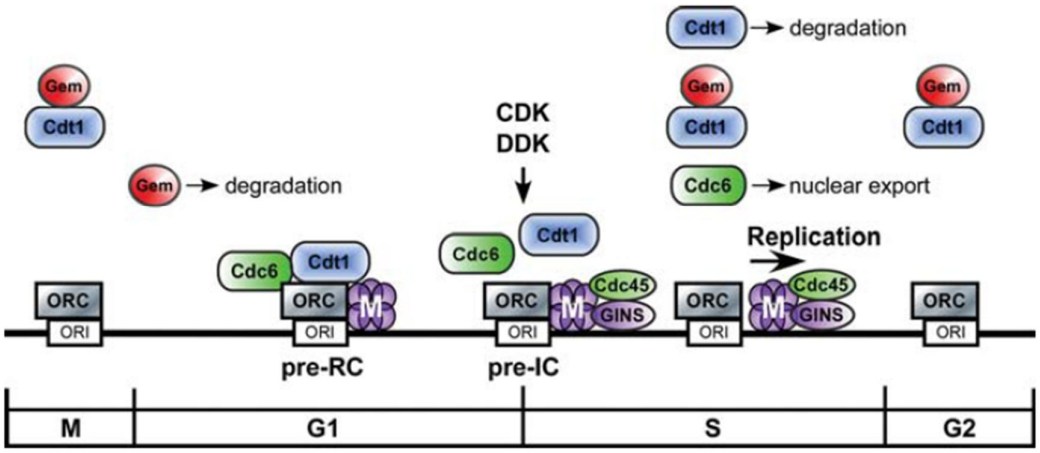
A ligação de Cdc6 à ORC é um passo importante na formação do complexo de pré-replicação (Liang et al, 1995) e essencial para a chegada das MCMs (Donovan et al, 1997). A atividade de CDK inibe a chegada de Cdc6 ao DNA para a formação do complexo de pré-replicação por meio de diferentes ações. Em levedura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

1.3.1.3 Cdt1 e MCM 2-7

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

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

Figura 1.5- Controle da replicação.



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

1.4 Origem de Replicação

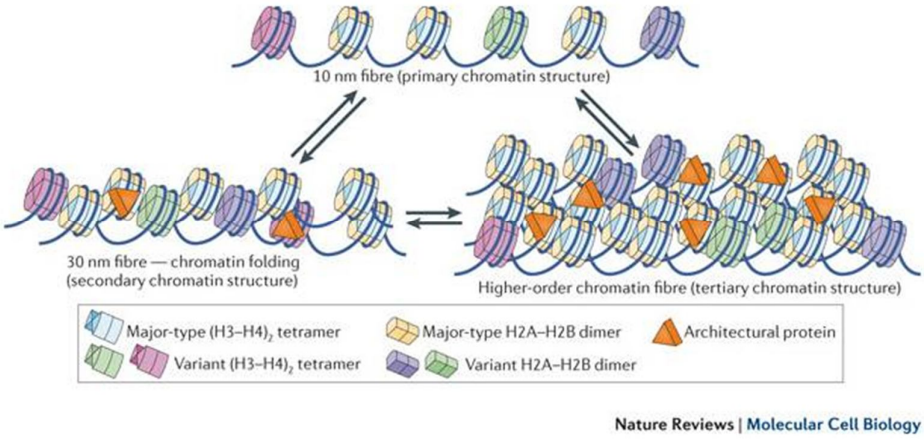
Apesar de diversos esforços na busca por uma sequência consenso de origem de replicação em eucariotos superiores, nada foi encontrado até agora. Porém, mais que uma sequência de DNA específica, tem-se descoberto que a arquitetura da cromatina é um ponto chave no estabelecimento das forquilhas de replicação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

1.4.1 Estutura da Cromatina

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

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

Figura 1.6- Nucleossomo e a estrutura da cromatina.



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

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

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

1.4.2 Origens de Replicação Early e Late

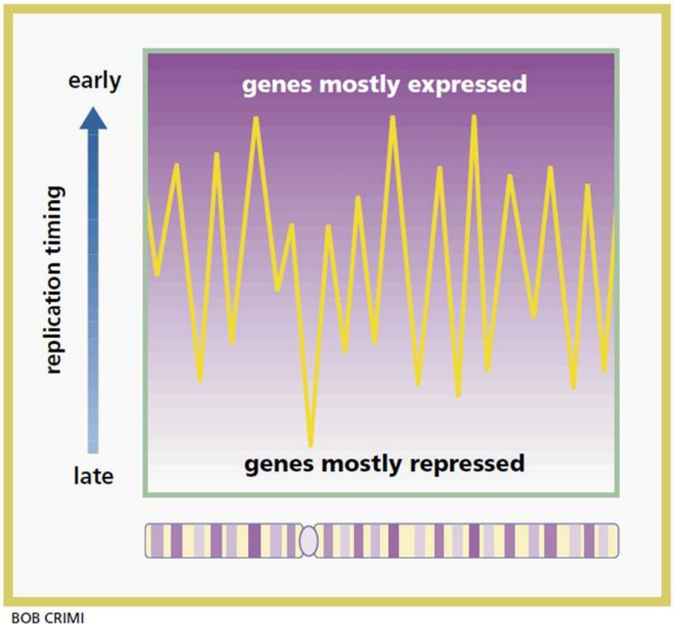
Outro aspecto das células apresentarem um grande genoma é que a duplicação de tamanho material genético é confinada a um curto espaço de tempo. Se o genoma humano, por exemplo, apresentasse apenas uma origem de replicação a sua duplicação levaria cerca de 20 dias (15). Por isso há múltiplas origens de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

1.4.2.1 Metazoários

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

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

Figura 1.7- Correlação entre transcrição e o momento da replicação.



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

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

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

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

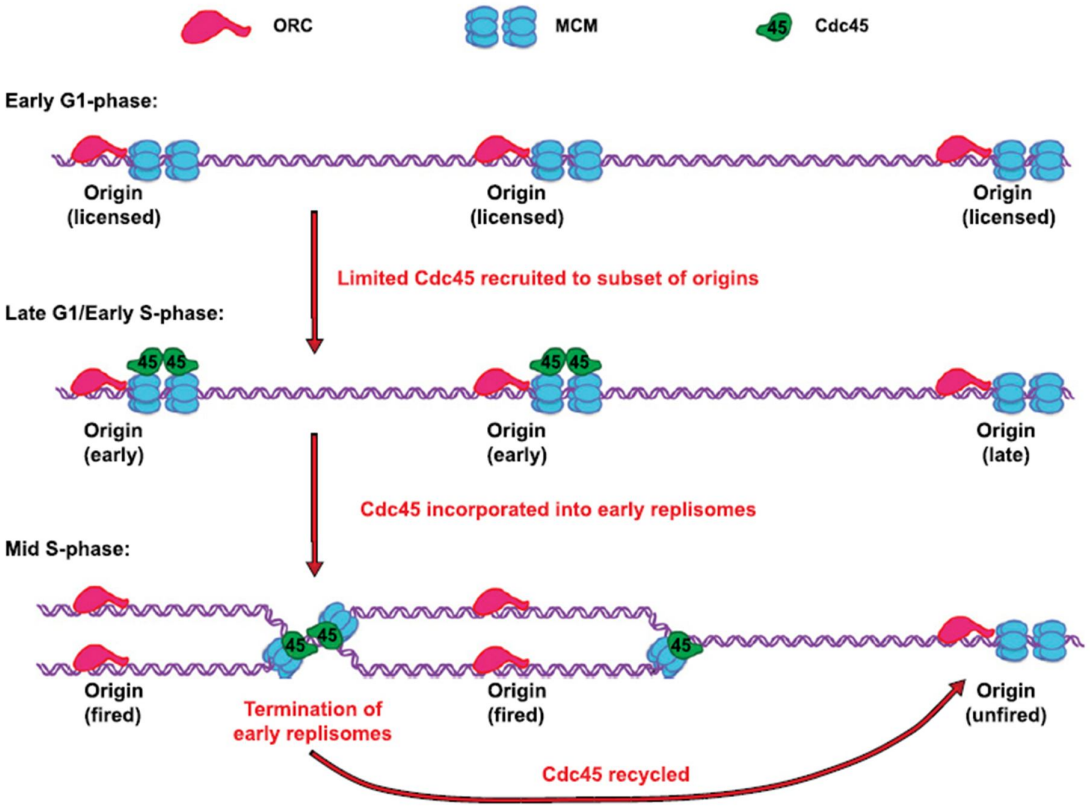
Portanto acredita-se que relação entre o nível de transcrição e o momento da replicação ocorra principalmente devido à questão de acesso à cromatina, já que ambos os processos dependem desse acesso para serem realizados e que origens *early* se encontram próximas a genes altamente transcritos, onde a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

1.4.2.2 Leveduras

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

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

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



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

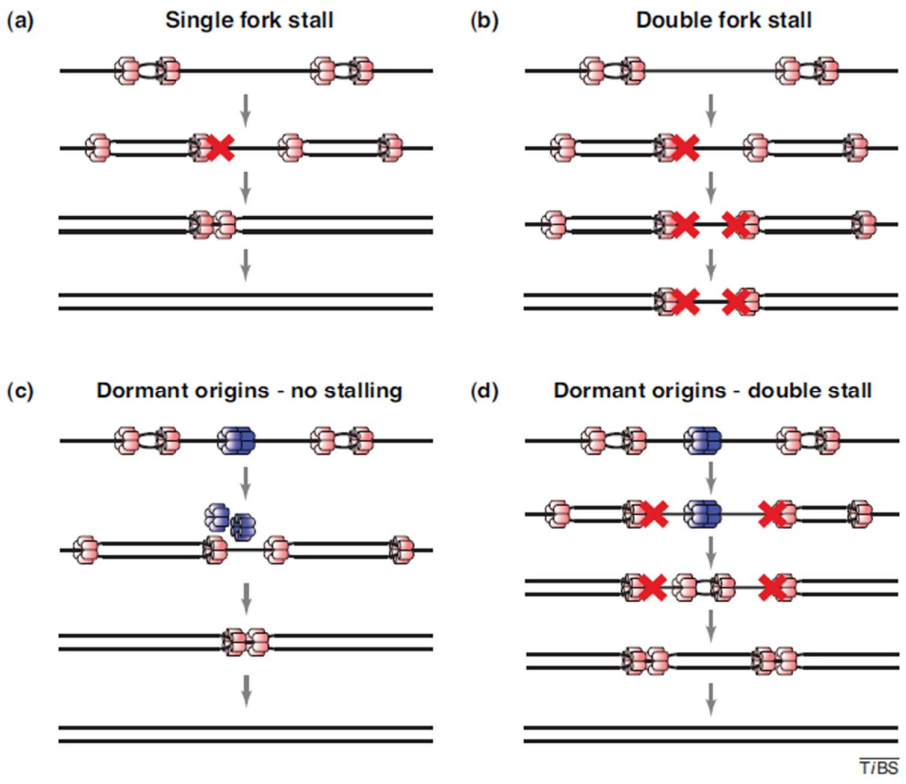
Mais recentemente foram identificadas algumas proteínas que também atuam na regulação de origens *early* e *late*. Os fatores de transcrição Fkh1 e Fkh2 participam do momento de disparo da maioria das origens *early* e também de algumas origens *late*, uma vez que células sem Fkh1 e 2 apresentaram profundas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

1.4.3 Origens Dormentes

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

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

Figura 1.9- Papel das origens de replicação dormentes.



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

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

1.5 Trypanosomas

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

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

1.6 Trypanosoma cruzi

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

Figura 1.10- Mapa das áreas endêmicas de *Trypanosoma cruzi*.

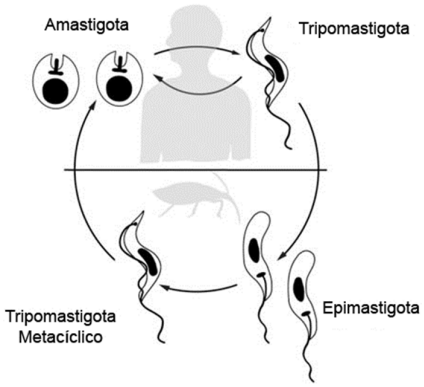
(70)

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

1.6.1 Ciclo de Vida

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

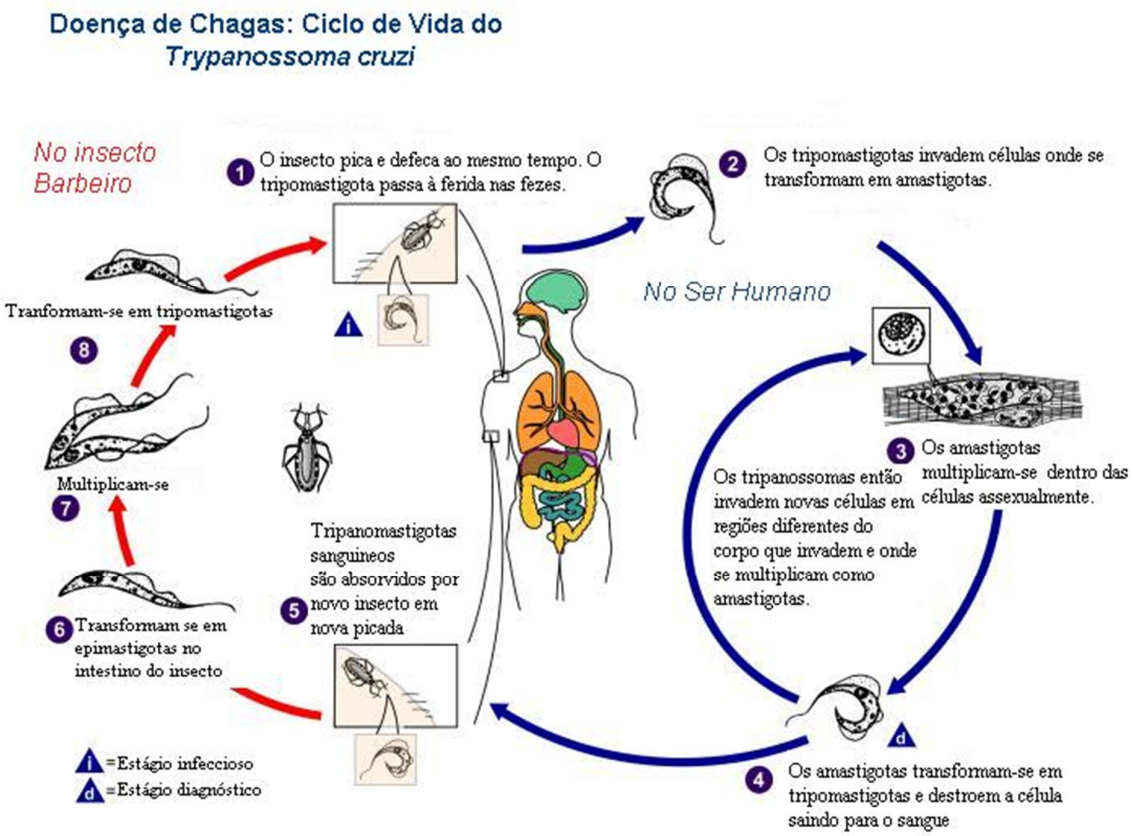
Figura 1.11- Diferentes formas de *T. cruzi* durante seu ciclo de vida.



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

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

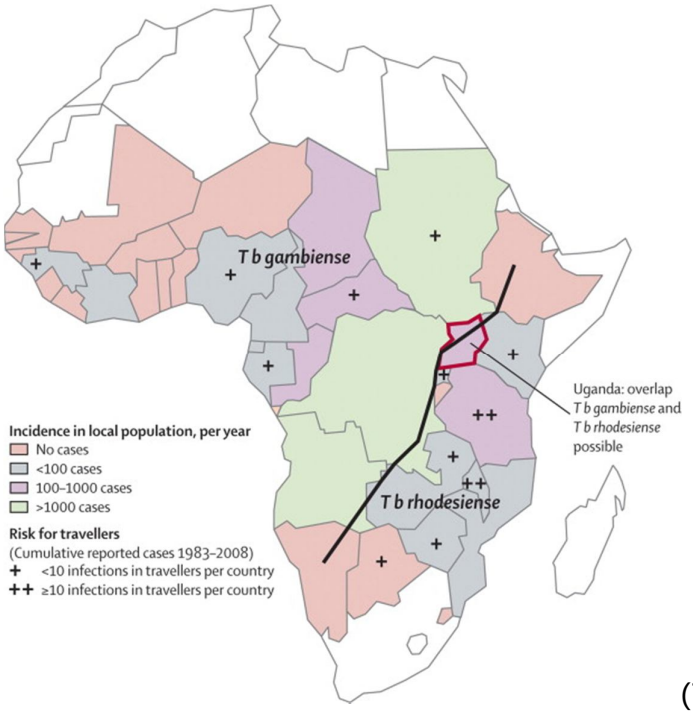
Figura 1.12- O ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.



1.7 Trypanosoma brucei

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

Figura 1.13- Mapa da distribuição de incidências das duas principais subespécies de *Trypanosoma brucei*.



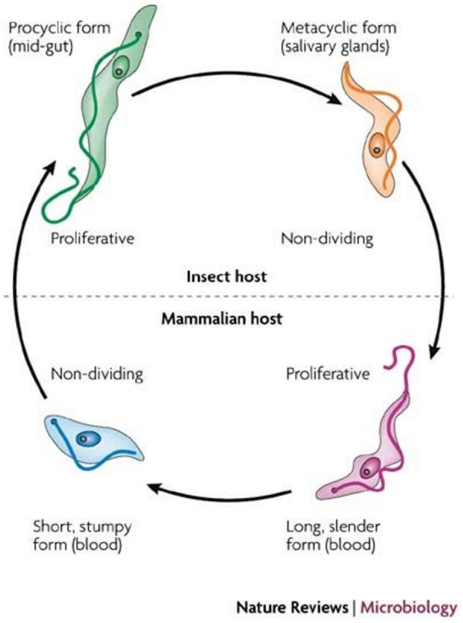
(71)

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

1.7.1 Ciclo de Vida

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

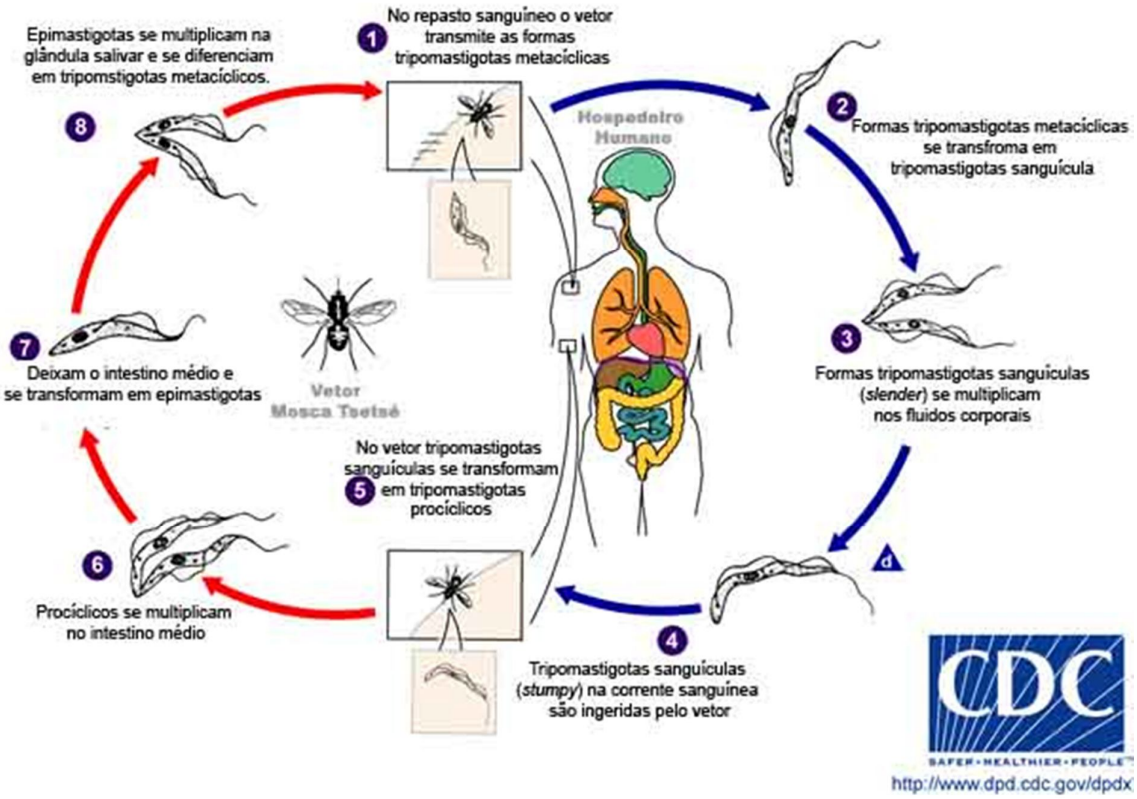
Figura 1.14- Formas replicativas e não replicativas de *T. brucei*.



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

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

Figura 1.15- Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*.



1.8 Ciclo celular em trypanosomas

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

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

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

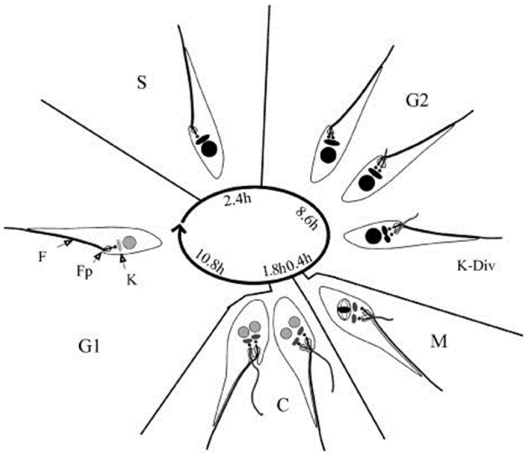
Diferente das enzimas envolvidas no controle do ciclo celular, os eventos morfológicos que marcam cada fase e que permitem que células em cultura exponencial sejam identificadas conforme a fase do ciclo celular em que está já foi bem caracterizado, tanto em *T. cruzi* quanto em *T. brucei.* Nestas células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

1.8.1 T. cruzi forma epimastigota

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

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

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



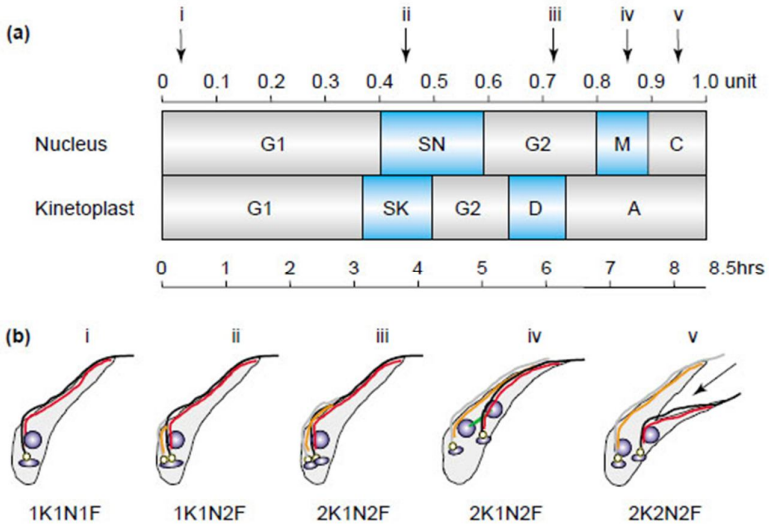
Fases do ciclo celular de 24h da forma epimastigota, na qual células com 1 núcleo (N), 1 cinetoplasto (K) e 1 flagelo (F) caracterizam células em G1 e S. Ao emergir o novo flagelo há indicação de células em G2 (1N1K2F) e após a segregação dos cinetoplastos as células atingem a fase M (1N2K2F). O núcleo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

1.8.2 T. brucei forma procíclica

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

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

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



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

1.8.3 Complexo de pré-replicação em trypanosomas

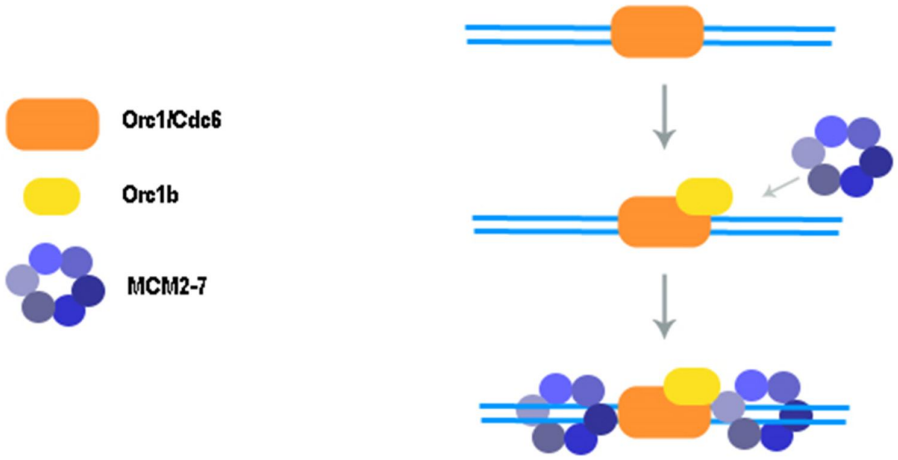
Durante a fase S ocorre a duplicação do material genético, sendo este iniciado nas origens de replicação. Nos trypanosomas as origens de replicação são licenciadas por um complexo de pré-replicação diferentes dos demais eucariotos. Em *T. cruzi* e *T. brucei* foi identificada uma proteína que é similar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

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

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

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

Figura 1.18- Complexo de pré-replicação em trypanosomas.



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

1.8.4 Replicação do DNA e seu controle em trypanosomas

O complexo de pré-replicação formado é então ativado em S, porém não se sabe por meio de qual mecanismo, uma vez que não foram encontrados os genes referentes a Cdc7,Dbf4, Sld2 e Sld3. Contudo o complexo CMG está presente em trypanosomas. Enquanto que o complexo MCM2-7 por si só não apresenta atividade de helicase em trypanosomas, o complexo formado por Cdc45-MCM2-7 e GINS possue atividade de helicase neste organismo(87). Portanto ao entrar em S, Cdc45 e GINS são recrutados para as origens, abrindo a dupla fita de DNA e permitindo o seu acesso pelas proteínas da replicação, tais como RPA, PCNA (90, 91) e DNA polimerases que estão presentes nestes organismos.

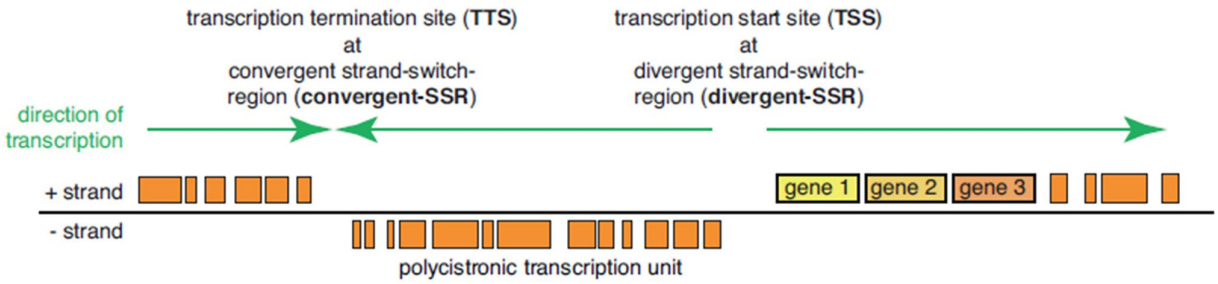
Quanto ao controle da replicação Orc1/Cdc6 parece não desempenhar uma função, pois permanece ligada ao DNA durante todo o ciclo celular de *T. cruzi* e *T. brucei* (86). Já o complexo MCM2-7 foi demonstrado estar presente no espaço nuclear durante todas as fases do ciclo celular em *T. brucei*, parecendo também não desempenhar papel no controle da replicação (87), porém não se sabe se há mudança da afinidade destas proteínas com o DNA durante o ciclo celular. Até o momento apenas a proteína Cdc45 parece desempenhar função no controle da replicação em *T. brucei*, uma vez que é expressa e se localiza no núcleo em todas as fases do ciclo, sendo exportada para o citoplasma durante a fase M (87).

1.8.5 Correlação entre transcrição e replicação em trypanosomas

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

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

Figura 1.19- Regiões de início e terminação de transcrição.



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

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

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

2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

*REFERÊNCIAS**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

14. Kaguni JM. DnaA: controlling the initiation of bacterial DNA replication and more. Annu Rev Microbiol. 2006;60:351-75.
15. Méchali M. Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010;11(10):728-38.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

81. Gourguechon S, Wang CC. CRK9 contributes to regulation of mitosis and cytokinesis in the procyclic form of Trypanosoma brucei. BMC Cell Biol. 2009;10:68.

82. Hammarton TC, Clark J, Douglas F, Boshart M, Mottram JC. Stage-specific differences in cell cycle control in Trypanosoma brucei revealed by RNA interference of a mitotic cyclin. J Biol Chem. 2003;278(25):22877-86.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

96. Martínez-Calvillo S, Nguyen D, Stuart K, Myler PJ. Transcription initiation and termination on Leishmania major chromosome 3. Eukaryot Cell. 2004;3(2):506-17.

97. Siegel TN, Gunasekera K, Cross GA, Ochsenreiter T. Gene expression in Trypanosoma brucei: lessons from high-throughput RNA sequencing. Trends Parasitol. 2011;27(10):434-41.

98. Siegel TN, Hekstra DR, Kemp LE, Figueiredo LM, Lowell JE, Fenyo D, et al. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in Trypanosoma brucei. Genes Dev. 2009;23(9):1063-76.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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