DAIANE DA ROCHA SOARES

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

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

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

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

Versão original

São Paulo
2014

Resumo

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

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

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

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

Abstract

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

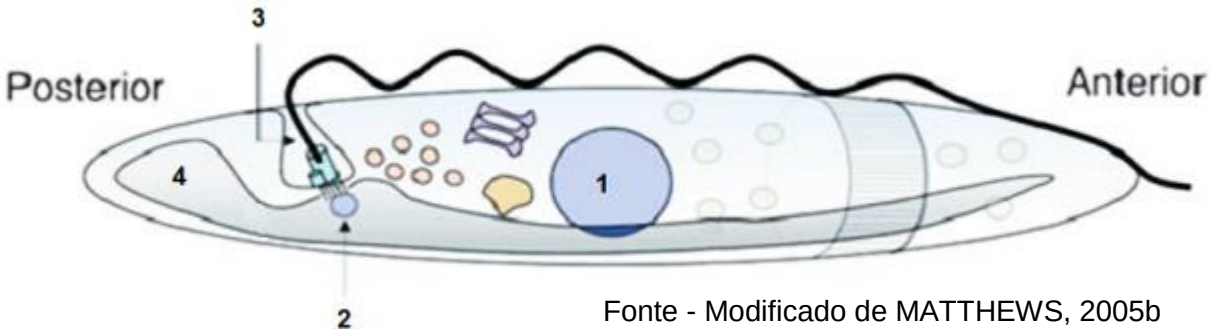
1.1 Tripanossomas

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

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

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

Figura 1- Arquitetura celular dos tripanossomas



Fonte - Modificado de MATTHEWS, 2005b

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

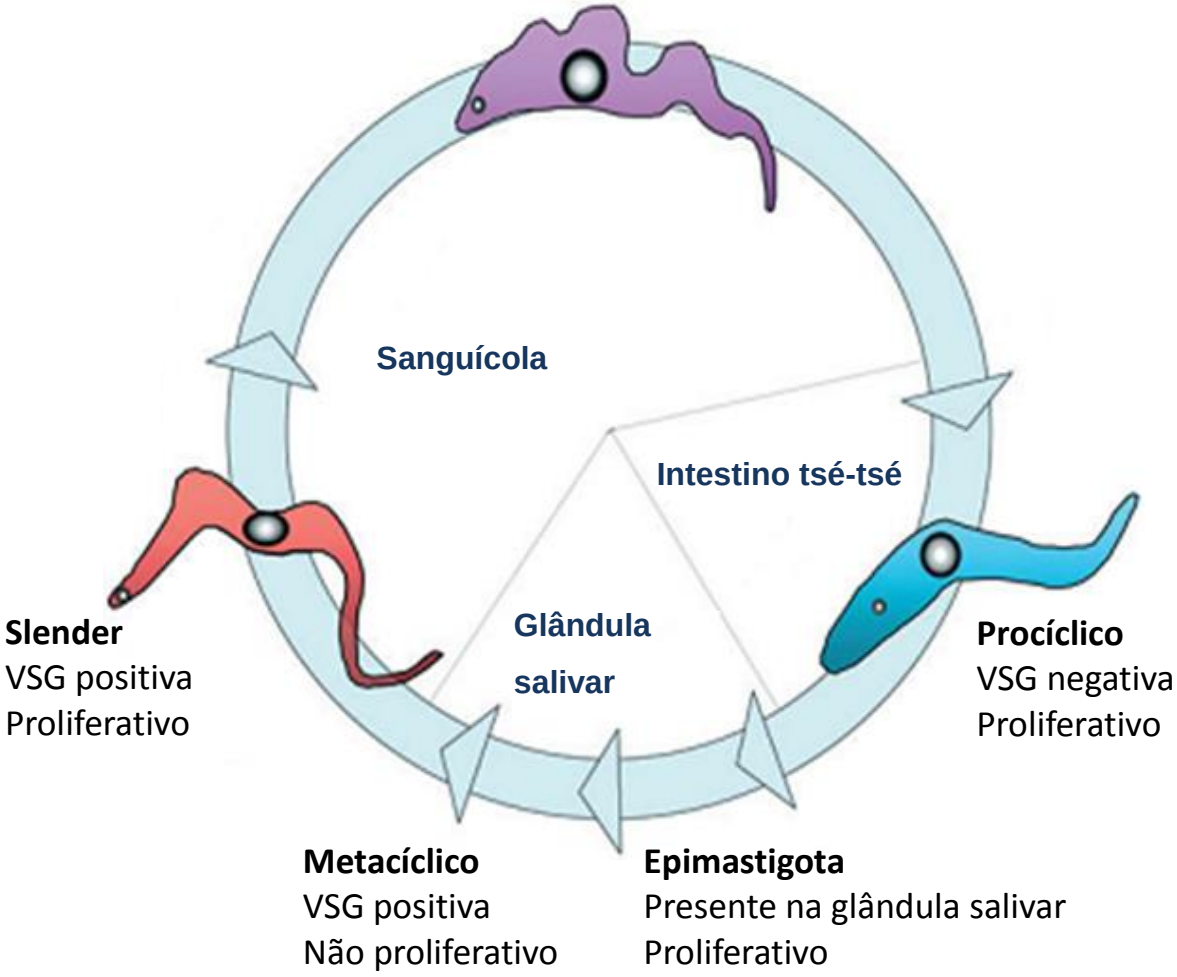
1.1.1 Trypanosoma brucei

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

1.1.2 Ciclo de vida

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

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



Fonte - Modificado de MATTHEWS, 2005

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

1.2 Replicação do DNA

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

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

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

Fonte - Modificado de MCGEOCH; BELL, 2008

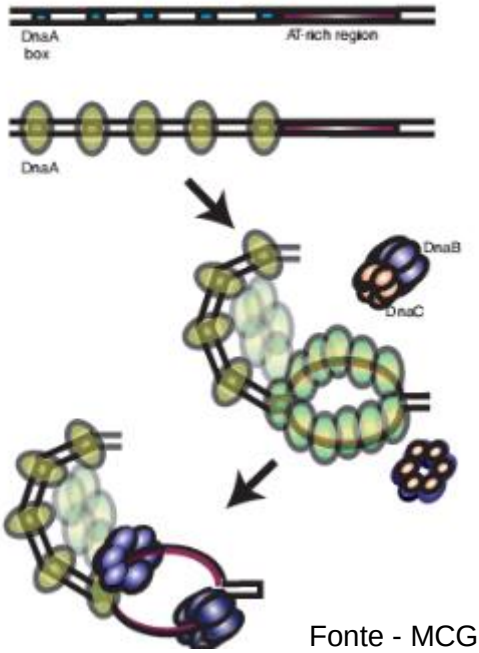
A replicação do DNA envolve uma série de estágios: A fase de iniciação ocorre no final da mitose, inicio de G_1. Nesta fase ocorre a montagem do complexo que define o sítio de inicio da replicação e recruta para este as proteínas que atuarão de fato no processo de duplicação do DNA. Este complexo é denominado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

1.3 Iniciação da replicação nos diferentes organismos

1.3.1 Bactérias

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

Figura 3 - Complexo de pré-replicação em bactérias



Fonte - MCGEOCH; BELL, 2008

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

1.3.1.1 Controle da replicação em bactérias

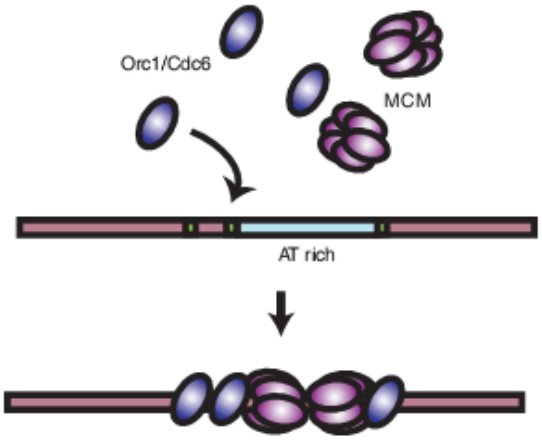
Semelhante aos eucariotos as bactérias também possuem mecanismos regulatórios para evitar a re-replicação. E em *E.coli* esse controle está na iniciadora DnaA. A DnaA livre se associa com a origem de replicação e em seguida se associa com o ATP. A associação de DnaA-ATP torna a DnaA inativa, ou seja,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

1.3.2 Archaea

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

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

Figura 4 - Complexo de pré-replicação em Archaea



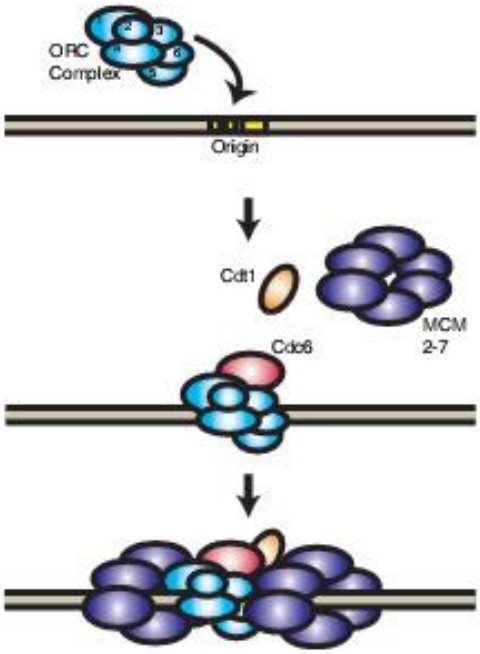
Fonte – MCGEOCH; BELL, 2008

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

1.3.3 Metazoários e leveduras

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

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



Fonte- MCGEOCH; BELL, 2008

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

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

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

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

1.3.3.1 Controle da replicação em metazoários e leveduras

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

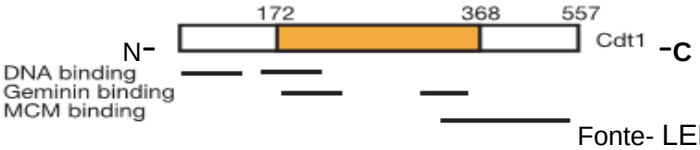
resintetizada na fase G1 (MENDEZ ; STILLMAN, 2003). Em mamíferos e leveduras o controle da replicação parece estar concentrado em Orc1, pois as Orcs de 2 a 6 permanecem ligadas à cromatina durante o ciclo celular. Na fase S, Orc1 é ubiquitinada e degradada pelo proteossomo. Na transição da fase M para G1 de um novo ciclo a Orc1 é resintetisada para que o complexo de pré-replicação possa ser formado (DE PAMPHILIS, 1993). Em *Saccharomyces cerevisiae* ORC permanece ligado à cromatina durante todo ciclo celular, porém durante a transição da fase G1/ S as subunidades Orc1, Orc2 e Orc6 são fosforiladas pelo complexo CDK1/Clb. Esta fosforilação impede a formação do CPR, prevenindo a formação deste complexo fora de M/G1. No início de G1 ORC é desfosforilada para que ocorra a montagem de novos complexos de pré-replicação (NGUYEN et al., 2001).

1.3.4 Proteínas do CPR de metazoários e leveduras

1.3.4.1 Cdt1

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

Figura 6- Esquema representativo da estrutura de Cdt1



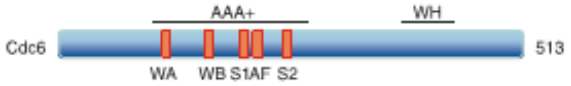
Fonte- LEE et al., 2004

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

1.3.4.2 Cdc6

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

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



Fonte - Modificado de KAWAKAMI; KATAYAMA, 2010

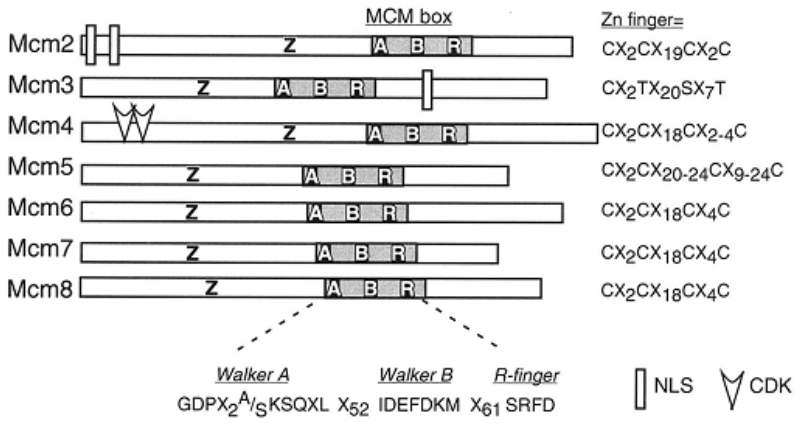
Neste esquema estrutural, está destacado a estrutura dos domínios importantes de cdc6 de *S.cerevisiae* bem como os motivos característicos da família AAA+ de ATPases. O número total de aminoácidos é descrito ao término da estrutura

1.3.4.3 MCM

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

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

Figura 8 - Esquema estrutural das proteínas do complexo MCM



Fonte - FORSBURG, 2004

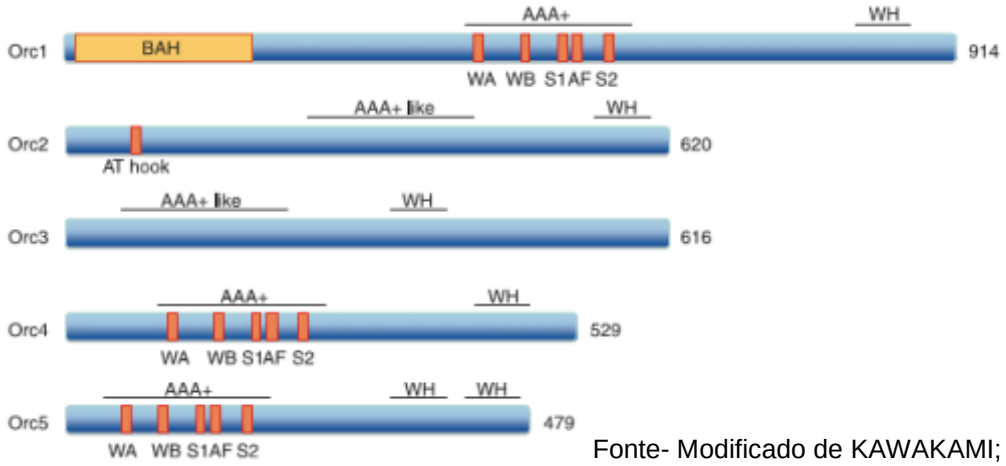
Neste esquema estrutural, está indicada a localização dos domínios importantes compartilhados por todas as proteínas do complexo MCM. Na região N-terminal, AAA+ de ATPases e na região C-terminal. O dedo de zinco está abreviado como “Z” na ilustração, o domínio walker A como “A”, walker B como “B” e o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

1.3.4.4 <u>ORC</u>

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

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

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



Fonte- Modificado de KAWAKAMI; KATAYAMA, 2010

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

1.3.4.5 ORC além da replicação

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

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

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

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

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

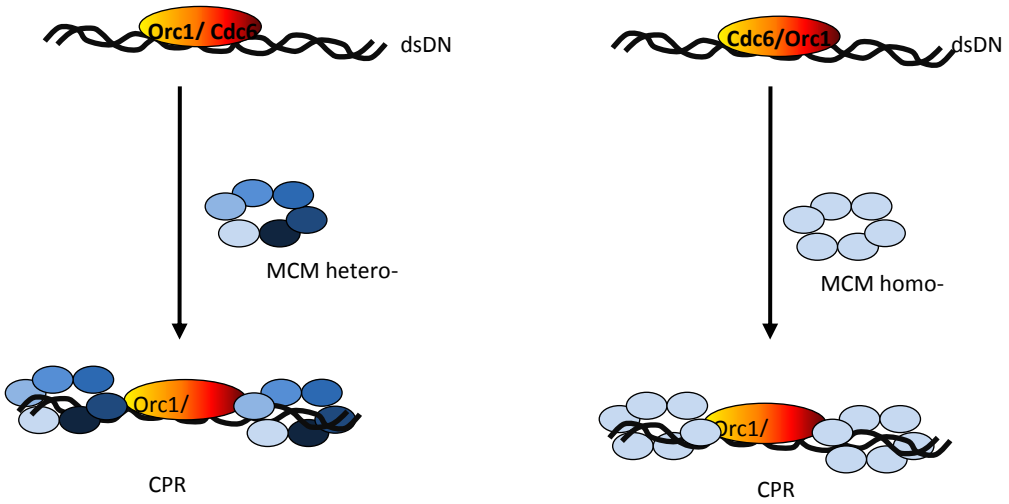
1.3.5 Tripanossomas

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

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

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

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



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

1.3.5.1 Controle da replicação em tripanosomas

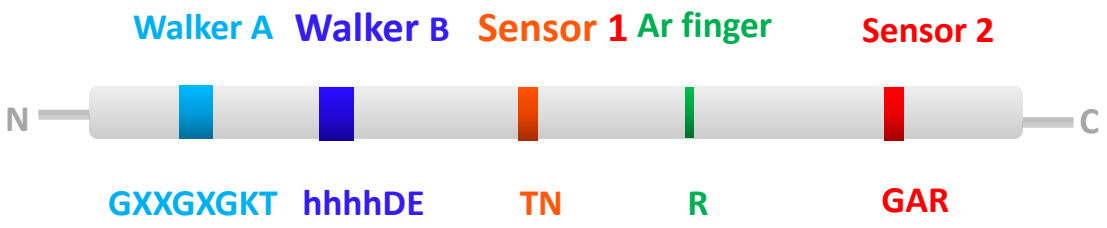
Atualmente sabe-se muito pouco sobre a regulação da replicação nuclear em tripanosomas. Mas é sabido que Orc1/Cdc6, MCM2-7 e Gins permanecem no núcleo durante todo o ciclo celular nas formas procíclicas, o que sugere que o mecanismo de controle da re-replicação não está na localização subcelular destes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

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

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

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

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



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

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

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

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

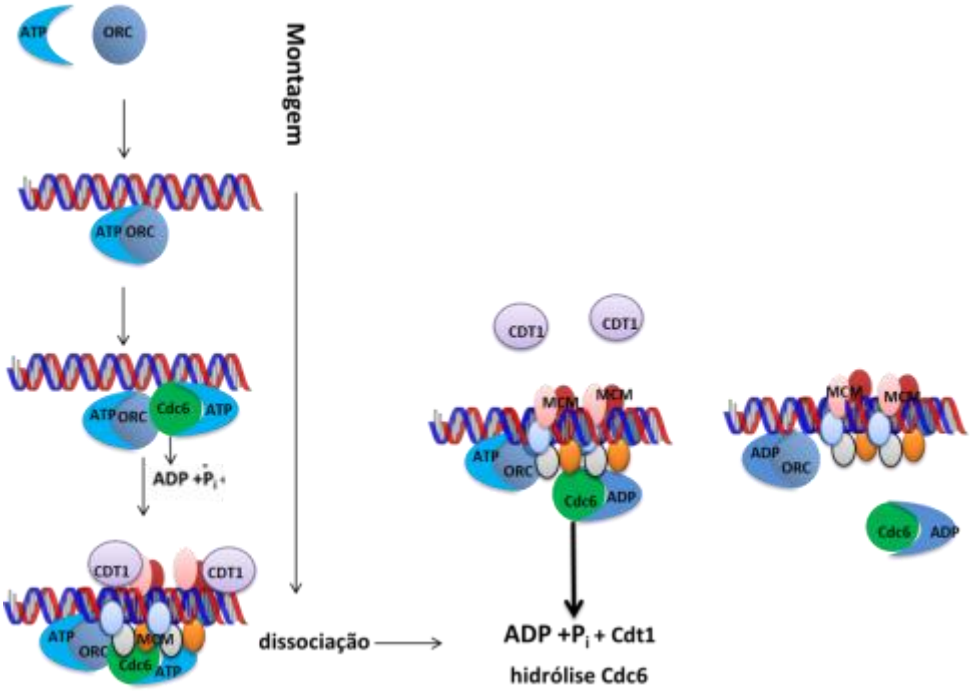
A função do dedo de arginina, também característico da família AAA+ de ATPases, foi pouco elucidada, mas um estudo com células de leveduras mostrou que este é essencial para viabilidade celular, pois as células com mutações neste resíduo de Arginina em Orc4 foram incapazes de crescer. Além de possuírem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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

*REFERÊNCIAS**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SEQUEIRA-MENDES J.; DÍAZ-URIARTE R.; APEDAILE A.; HUNTLEY D; BROCKDORFF N.; GÓMEZ M. Transcription initiation activity sets replication origin efficiency in mammalian cells. **PLoS genetics**, v. 5 p. 1000446, 2009

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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