

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 demonstrar 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 cruzi*. *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 (*Gap1*), S (Síntese de DNA), G2 (*Gap2*) e mitose (M). A sua progressão é regida pela ação de diferentes combinações de ciclinas-CDKs (*cyclin 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).

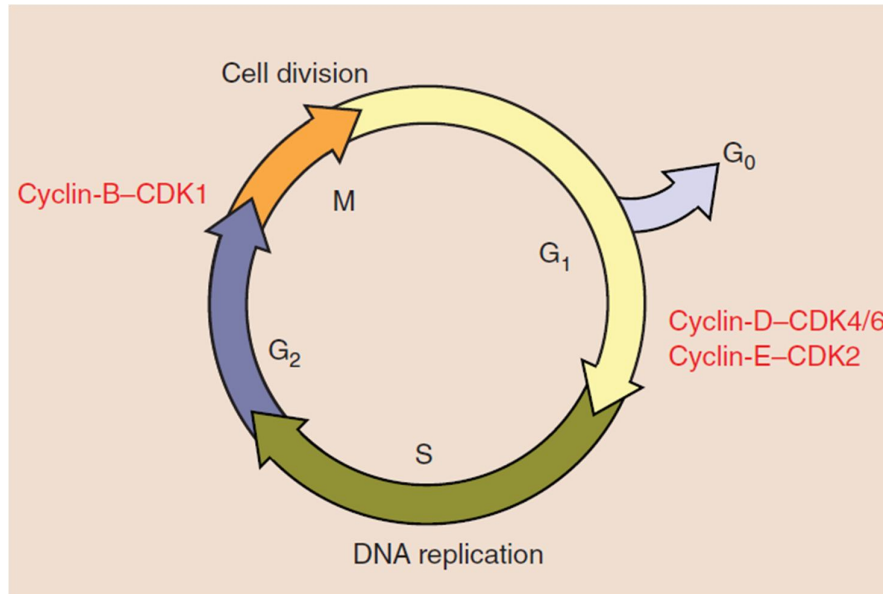
A inibição de ciclinas E não impede a entrada de células em G1 para S, porém a proliferação celular torna-se mais lenta e também há a diminuição da resposta celular a estímulos mitogênicos (6). Já a superexpressão de ciclinas E tem sido frequentemente observada em vários tipos de câncer com agressividade 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 ciclina E-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 sequências 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 comparado a eucariotos superiores (15).

1.2.2 Leveduras e Metazoários

1.2.2.1 Origens de Replicação Específicas

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 *Saccharomyces cerevisiae* 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.

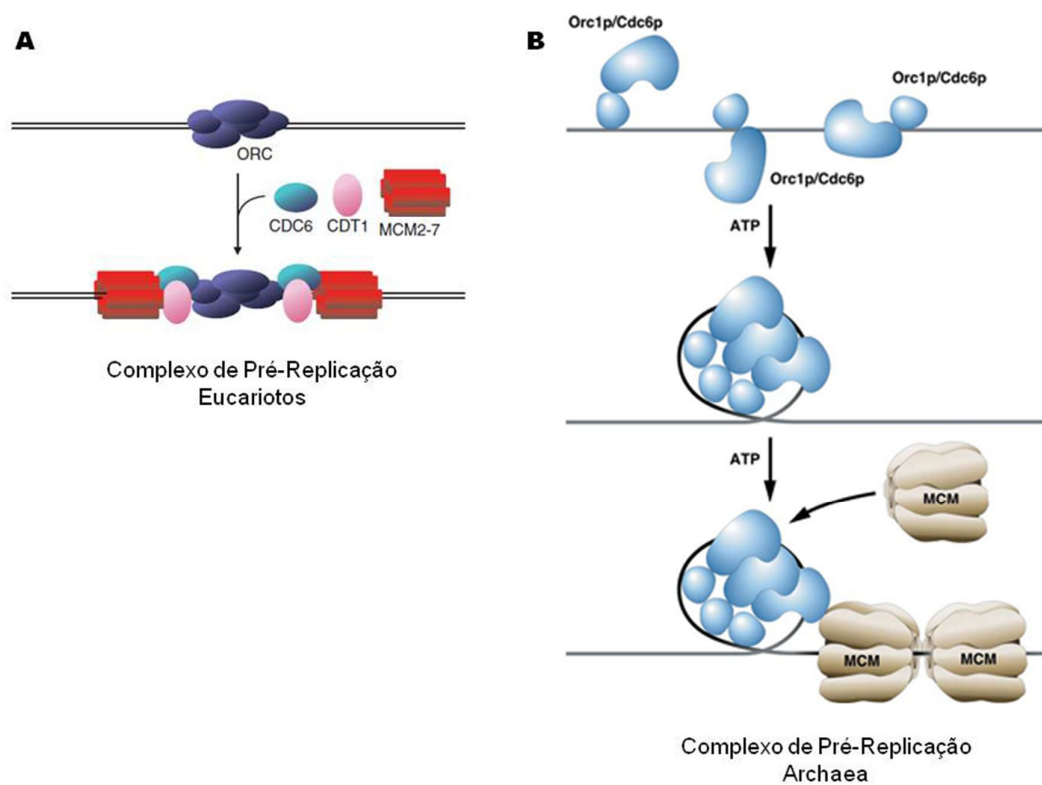
Primeiramente um complexo formado por seis subunidades denominado *Origin Recognition Complex* de 1 a 6 (ORC₁₋₆) se liga a origem de replicação e recruta outras duas proteínas Cdc6 (*Cell Division Cycle*) e Cdt1 (*Cdc10-dependent transcript factor 1*). Esta última recruta outro complexo formado por seis proteínas, MCM₂₋₇ (Mini Chromosome Maintenance de 2 a 7) à origem de replicação. Neste ponto tem-se formado o complexo de pré-replicação (ORC₁₋₆, Cdc6, Cdt1 e MCM₂₋₇ /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 MCM₂₋₇ 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 MCM₂₋₇ para formar o CPR é dependente de Cdc6 e Cdt1. Este último interage fisicamente a componentes do complexo MCM₂₋₇, 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 MCM₂₋₇ 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 Archaea.

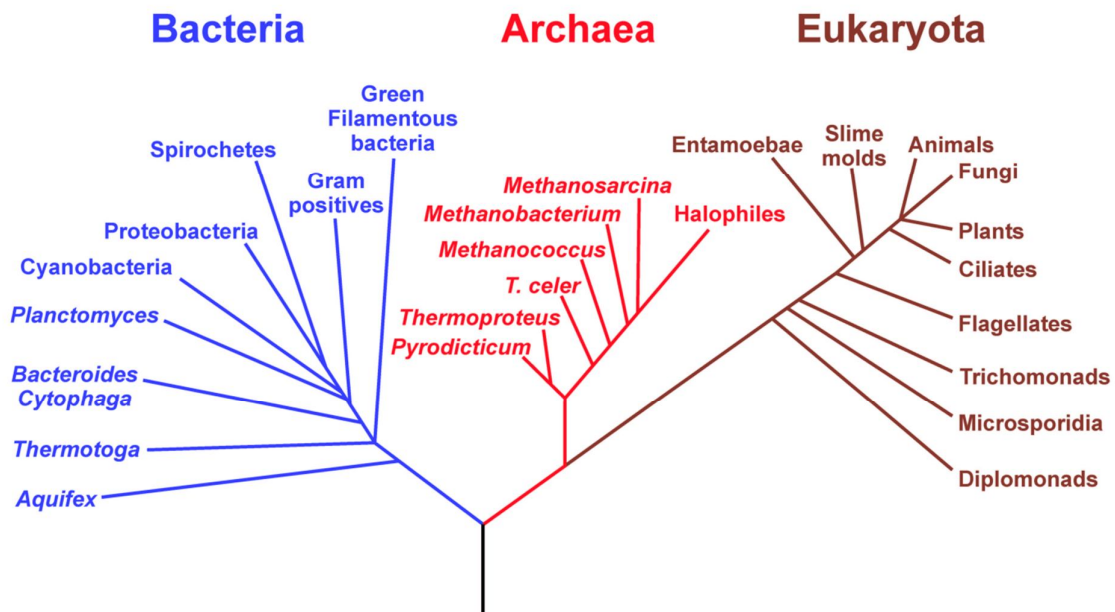


Em (A) o Complexo de Pré-Replicação de eucariotos formado por ORC₁₋₆, CDC6, CDT1 e MCM₂₋₇ (20). Em (B) o CPR de archaea formado por ORC/CDC6 e complexo MCM, onde é sugerido que ORC/CDC6 forme um complexo semelhante ao de eucariotos (27).

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).

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

